



TITLE:

哺乳類卵胞の成熟と黄体化に係わる遺伝子の解析と機能性顆粒膜細胞株の樹立(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

田中, 利明

CITATION:

田中, 利明. 哺乳類卵胞の成熟と黄体化に係わる遺伝子の解析と機能性顆粒膜細胞株の樹立. 京都大学, 1994, 博士(理学)

ISSUE DATE:

1994-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3094326>

RIGHT:

哺乳類卵胞の成熟と黄体化に係わる遺伝子の解析と機能性顆粒膜細胞株の樹立

理学研究科生物物理学専攻
遺伝子構造学学科
田中利明

目次

要旨	1
序論	3
背景	3
i) 哺乳類の卵胞と性周期	3
ii) 顆粒膜細胞の役割	3
iii) 顆粒膜細胞の機能調節	4
iv) 顆粒膜細胞内の情報伝達	5
本研究の目的	6
材料と方法	7
結果	
第一部：時期特異的に発現する遺伝子の単離および解析	17
卵胞の調製と顆粒膜細胞	17
cDNA ライブラリーの作成と	
Differential hybridization によるスクリーニング	17
Modified plaque hybridization	17
Northern hybridization に発現時期の解析	17
コラゲナーゼインヒビターの免疫組織学的検出	19
TS507 の発現組織の分析	19
第二部：顆粒膜細胞株の樹立：その特性と減数分裂抑制活性	20
薬剤耐性細胞株の単離と導入遺伝子の発現について	20
顆粒膜細胞の形態について	20
ホルモンまたは薬剤による cAMP 濃度の変化	20
卵母細胞の減数分裂維持あるいは再開におよぼす活性	21
ホルモンまたは薬剤による遺伝子発現の変化について	22
考察	
TS543 について	23
TS507 について	25
TS049 と TS537 について	26
TS 052 について	28
初代顆粒膜細胞および顆粒膜細胞株について	29
導入した外来遺伝子の発現について	30
ゴナドトロピンまたは薬剤による cAMP の誘導について	31
顆粒膜細胞株の卵成熟抑制活性について	33

細胞株での遺伝子の発現について	3 4
顆粒膜細胞株の性質に関するまとめ	3 5
謝辞	3 6
参考文献	3 7
図表	

要旨

脊椎動物の卵形成は卵巣の濾胞（卵胞）内で行なわれるが、その過程で濾胞細胞が助細胞として重要な役割を果たしている。顆粒膜細胞は卵胞を取り囲む基底膜の内腔側に局在する濾胞細胞で、ギャップ結合を介して卵と連結している。この細胞は、脳下垂体からのゴナドトロピンに応じてステロイドホルモンや成長因子などを分泌することにより、卵母細胞の発育制御も含めた卵胞の機能発現において中心的な役割を果たしている。

哺乳動物において卵母細胞は、その発生途上の胞状卵胞中で、顆粒膜細胞から分泌される二次仲介物質（減数分裂抑制因子）の作用により減数分裂が停止した状態に留まっている。成熟した個体において、性周期に入った卵胞では脳下垂体で産生される黄体形成ホルモン（LH）に应答して卵母細胞－顆粒膜細胞間のギャップ結合が切り離され、その結果生じる減数分裂抑制因子の減少および卵成熟促進因子（MPF）の活性化により減数分裂が再開し、卵の成熟、排卵へと導かれる。排卵にともなって、顆粒膜細胞は性質、形態共に異なる黄体細胞へと分化するとともに急速に増殖を開始し黄体を形成するようになる。そして、黄体細胞から産生されるプロゲステロンは子宮に作用し、受精卵の着床などのコントロールに関与している。これまでの知見は、性周期におけるこれらの一連の現象には、脳からのホルモンのエンドクライン的な作用に加えて、顆粒膜細胞および黄体で独自に産生される酵素や因子がパラクライン的な機構で深く関わっていることを示唆している。

本研究では、卵胞にみられる諸反応を分子レベルで理解する第一歩として、まず顆粒膜細胞および黄体の各時期でそれぞれ特異的に発現している遺伝子を単離することを試みた。ブタ顆粒膜細胞および黄体由来の cDNA ライブラリーを用いて Differential hybridization を行い、それぞれの細胞で特異的に発現している cDNA クローンを単離した。その中から、特に顕著な時期特異性を示した 5 個のクローン（顆粒膜細胞特異的なクローン 1 個、黄体特異的なクローン 4 個）をとりあげ、遺伝子構造、発現時期および発現部位についての詳細な検討を行った。

データベースでの検索により、そのうち 4 クローンについては、既知の遺伝子との間に強いホモロジーがみられた。まず、顆粒膜細胞特異的に発現しているものとしてインヒビン遺伝子が同定された。インヒビンは顆粒膜細胞で産生され、脳下垂体からのゴナドトロピン産生をフィードバックコントロールしている因子である。一方、黄体特異的に発現のみられるものとして、コラゲナーゼインヒビター、ミトコンドリア ATPase、チトクローム c 還元酵素の各 mRNA に相当するクローンが同定された。このうち、コラゲナーゼインヒビターについては、黄体での生理的な役割をさらに検討するために、免疫組織化学的な手法により産物の局在性についての解析を行なった。

その結果、開花期の黄体において、基底膜あるいは実質部の血管周囲の結合性組織に局在していることが認められ、コラゲナーゼ自身の局在性との比較から黄体の形成期から開花期における組織の増殖・肥大の制御に重要な係わりをもっていることが示唆された。黄体特異的な発現がみられた残る一つのクローンは、雄性組織である前立腺の分泌タンパク質 (Human Prostatic Secretory Protein : PSP) に有意なホモロジーを示すタンパク質をコードしていた。この遺伝子の黄体組織内での発現部位を調べるため *in situ* ハイブリダイゼーションを行ったところ、血管周囲の黄体実質細胞に強い発現が確認された。PSP はヒト前立腺でその発現が報告されているが、この新しく単離されたブタ遺伝子のヒトおよびブタ前立腺での発現は確認されなかった。これらのことから、この遺伝子は、PSP にホモロジーを持ちながら、PSP とは異なり（性特異的に）黄体で機能するタンパク質であることが予想される。

つぎに、顆粒膜細胞の挙動をより詳しく解析するための *in vitro* 系を設定する目的で、外来遺伝子導入により安定な顆粒膜細胞株を樹立した。得られた顆粒膜細胞株のいくつかでは、初代顆粒膜細胞と同様にゴナドトロピンおよびフォルスコリンで細胞内 cAMP 濃度の上昇がみられた。また、これらの細胞株では初代顆粒膜細胞で報告されている卵成熟抑制活性およびゴナドトロピンなどによる遺伝子発現の変化もみられた。これらのことから、得られた顆粒膜細胞株は初代顆粒膜細胞の性質を保持しており、培養系を利用した顆粒膜細胞の解析への途が開けたと考えられる。

背景

i) 哺乳類の卵胞と性周期

哺乳動物における卵形成はおもに卵巣上の濾胞（卵胞）においておこなわれ、以下のような経過をたどる（加藤、1974）（図1）。単層で扁平な卵胞細胞が卵母細胞を取り囲み原始卵胞ができる。卵胞細胞は増殖分化して基底膜の内側に数層の顆粒膜細胞層を形成し、成長を開始した卵母細胞を包み発育卵胞となる。これらの顆粒膜細胞間、および顆粒膜細胞と卵母細胞間にはギャップ結合が存在し（Gilula *et al.*, 1978; Albertini *et al.*, 1974; Amsterdam *et al.*, 1976; Merc *et al.*, 1972; Bortolussi *et al.*, 1977; Bjersing *et al.*, 1974; Anderson *et al.*, 1976）、それらを通して糖（Rieske *et al.*, 1975）、アミノ酸、ペプチド（Johnson *et al.*, 1971; Simpson *et al.*, 1977）その他の代謝物質（Sherizky *et al.*, 1988）あるいは cAMP や Ins(1,4,5)P₃（Sandberg *et al.*, 1992）といった低分子のシグナル伝達物質が輸送される。卵胞がさらに発育し、顆粒膜細胞の間に間隙ができて卵胞液がたまるようになる（胞状卵胞）と、卵母細胞はその成長を完了する。成熟した個体において、卵胞刺激ホルモン (FSH) の作用により、胞状卵胞はグラーフ卵胞になり、卵母細胞は卵胞腔に突出するようになる。さらに黄体形成ホルモン (LH) の働きにより卵母細胞が成熟に向かうとともに卵胞腔は破れ、卵母細胞は卵胞液と共に卵巣外へ排出される（排卵）。

排卵にともなって破裂した血管やリンパ管から血液やリンパ液があふれ、卵胞腔に充満すると共に、顆粒膜細胞が卵胞腔中央部に向けて増殖を開始する（出血体一初期の黄体）。顆粒膜細胞は黄体細胞に分化し、また結合組織も血管を伴って黄体細胞の間に樹枝状に進出して黄体が完成し、その機能を発揮するようになる（開花期の黄体）。なお、排卵された卵母細胞が受精しない場合、黄体は退行し中心部から壊死が始まる（退行期の黄体）。そして、残った黄体は変性し結合組織で埋まる（白体期）。

ii) 顆粒膜細胞の役割

顆粒膜細胞は、上述のように排卵前の卵胞内で上皮層として卵のまわりを取り囲んでいる細胞である（図2a矢印）。また基底膜の外周には莢膜細胞が存在し、顆粒膜細胞と共同でエストロゲン等のステロイドホルモンの合成などに関わっている。

図1にみられる哺乳動物の卵形成過程および卵胞の成長・分化過程において、顆粒膜細胞は二つの大きな役割を担っている。一つは、卵成熟を抑制する役割である。卵形成の過程において卵母細胞は減数分裂が停止した状態（第一次減数分裂前中期での停止）にあるが、この停止の維持に直接関与している因子が顆粒膜細胞で産生されていると考えられており（Channing *et al.*, 1982; Chang, 1955; Sato *et al.*, 1986; Sato *et al.*,

1984; Sato *et al.*, 1982; Tsafiriri *et al.*, 1975; Tsafiriri *et al.*, 1982; Tsafiriri *et al.*, 1985; Stone *et al.*, 1978; Sirard *et al.*, 1990)、現在までに減数分裂抑制因子として MAF (Maturation Arresting Factor: Sato *et al.*, 1986)、OMI (Oocyte Maturation Inhibitor: Stone *et al.*, 1978) などが報告されている。この減数分裂停止状態は、成熟した個体の脳下垂体から分泌されるゴナドトロピン (特に LH) に応答してギャップ結合の崩壊と排卵が生じた時点で解除される (Alberts *et al.*, 1983; 加藤, 1974; Sarthy *et al.*, 1982; Recowsky and Satterlie, 1985)。二番目の役割として、排卵後に黄体を形成することである。排卵に伴い顆粒膜細胞は性質、形態共に全く異なる黄体細胞へ分化し、急速に分裂増殖を開始する (図 2b) (Gore-Langton and Armstrong, 1988; Hanukoglu, 1989; Hanukoglu and Hanukoglu, 1986; Hedin *et al.*, 1987; Hsue *et al.*, 1984; Richards and Hedin, 1988; Podger *et al.*, 1986; Rodger *et al.*, 1987; Toaff *et al.*, 1983; Tuckey *et al.*, 1988)。その結果形成される黄体 (図 2c) ではプロゲステロンが産生され、受精卵の着床などのコントロールに係わっている (Knobil and Neill, 1988)。

iii) 顆粒膜細胞の機能調節

上述のゴナドトロピンやその分泌調節に係わる GnRH などは脳で分泌された後、血流で卵巣に運ばれエンドクライン的に卵巣の機能制御に関わっているが、最近、卵細胞ではパラクライン的あるいはオートクライン的な作用を示す因子の存在が注目されている。エストラジオール、プロゲステロンといったステロイドホルモンはその代表的なものであるが、非ステロイド調節因子であるいくつかの増殖/成長因子も同様な機構で卵細胞の成長制御に関与していることが明らかになってきている (Tanaka *et al.*, 1993; Hsueh *et al.*, 1984)。例えば、IGFs とそのレセプターは顆粒膜細胞で産生され (Oliver *et al.*, 1989; Hernandez *et al.*, 1989; Hernandez *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1991; Hsu and Hammond, 1987; Hammond *et al.*, 1985; Mondschein *et al.*, 1990)、FSH 刺激による顆粒膜細胞でのステロイドや LH レセプター、インヒビンの産生をオートクライン的に制御している (May *et al.*, 1980; Adashi *et al.*, 1985b; Adashi *et al.*, 1984; Adashi *et al.*, 1985; Davoren 1986; Bicsak *et al.*, 1986; Hernandez *et al.*, 1989)。さらに IGFs の結合タンパク質である IGF-BPs は同様に顆粒膜細胞で産生されることによって IGFs の作用を調節しており、その結果として FSH と IGFs、IGF-BPs の間には複雑な制御関係が存在していると予想されている (Liu *et al.*, 1993)。また、EGF、bFGF については顆粒膜細胞によるエストラジオールやインヒビンの産生をそれぞれネガティブに制御していることが知られている (Hsueh *et al.*, 1984; Adashi *et al.*, 1988; Baird and Hsueh, 1986)。

これまで卵細胞の制御は脳下垂体からのゴナドトロピンにより全て行われていると考えられていたが、実際にはゴナドトロピンは一つの開始のシグナルとして捉えるべき

で、上述のようにその作用を調節する非ステロイド調節因子の存在が卵巣の機能に不可欠であることがわかってきている。このような点から顆粒膜細胞はエンドクライン、パラクライン、オートクライン的に作用する様々なペプチドホルモン、ステロイドホルモン、増殖/成長因子からのシグナルを受け取り、卵細胞の発育と機能発現に直接関わっている細胞であると考えられる。

iv) 顆粒膜細胞内の情報伝達

顆粒膜細胞に作用する様々な因子は細胞内の cAMP 濃度を調節することによりその生理機能を発揮することが知られている。実際、卵細胞発育の引金となる FSH, LH のレセプターは 7 回膜貫通型であり (Sprengel *et al.*, 1990; Parmentier *et al.*, 1989; Frazier *et al.*, 1990; McFaland *et al.*, 1989)、G タンパク質を経てアデニレートシクラーゼとカップリングしていることが予想されている (Sprengel *et al.*, 1990; McFaland *et al.*, 1989; Loosfelt *et al.*, 1989; Marsh, 1976)。一般に顆粒膜細胞の cAMP 濃度を上昇させる因子は黄体細胞への成熟を促進し、逆に上昇を抑制する因子は顆粒膜細胞の成熟を阻害する方向に働くと考えられる。例えば、フォルスコリンなど細胞内の cAMP 濃度を直接上昇させる薬剤処理により、ステロイドホルモンの産生量の増加など、FSH 処理と同じ現象が生じる (Klinlen and Stevenson, 1977; Funkenstein *et al.*, 1984; Richards and Hedin, 1988; Simpson and Waterman, 1988)。また、cAMP 量の上昇により cAMP 依存的タンパクキナーゼの活性が上昇することも報告されている (Vaitukaitis *et al.*, 1975)。さらに、顆粒膜細胞内では、cAMP 以外にもカルシウム (Ranta *et al.*, 1985) および PKC (Shinohara *et al.*, 1985) が GnRH などのシグナル伝達に働いていることも報告されている。

顆粒膜細胞では、FSH (Hsueh *et al.*, 1984; Solano *et al.*, 1980; Nakano *et al.*, 1983; Rao 1977)、LH (Amsterdam *et al.*, 1981; Richards *et al.*, 1976a; Richards *et al.*, 1976b) に加えて、様々な因子に対するレセプターの発現も確認されている。例えば、プロゲステロン分泌などの黄体機能に関して重要な働きを担っているプロラクチン (PRL) は、排卵前の卵細胞内に存在する顆粒膜細胞や黄体細胞の表面に存在するレセプターを介して作用することがわかっている (Midgley *et al.*, 1973; Richards *et al.*, 1976; Rolland *et al.*, 1975; Hsueh *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 1979; Navikis *et al.*, 1982)。また、視床下部から分泌され、専ら脳下垂体前葉からのゴナドトロピン分泌の促進に働くと考えられていた GnRH では、顆粒膜細胞表面に直接の結合部位が存在し (Pelletier *et al.*, 1981; Pieper *et al.*, 1981; Ranta *et al.*, 1981)、FSH によるプロゲステロン分泌や、LH および PRL レセプターの発現を抑制する活性があることなどが明らかになっている (Hsueh *et al.*, 1979; Hsueh *et al.*, 1979; Hsue *et al.*, 1980)。さらに顆粒膜細胞が産生する IGF-1 は自らに作用することによって FSH による cAMP 産生を強める活性を持ち、逆に EGF, bFGF

はFSH処理によるcAMPの上昇を抑える活性があると報告されている(Knecht and Catt, 1983a; Oury and Darbon, 1988)。以上の知見は、それぞれの因子が顆粒膜細胞表面のレセプターに働いてFSHの作用を増強または減衰させることにより、顆粒膜細胞が担う複雑な機能発現を調節していると考えられる。

これらのリガンドによる刺激と細胞内シグナル伝達により、最終的には顆粒膜細胞内での遺伝子発現の変化が誘導される。例えば、FSH, LHといったゴナドトロピンや各種の増殖/成長因子により、インヒビンのmRNA量が変化することや(LaPolt *et al.*, 1990)、FSHもしくは細胞内のcAMP濃度を増加させる薬剤処理により、ビンキュリン、 α -アクチニン、アクチンといった遺伝子のmRNA量が減少することなどが報告されている(Ben-Ze'ev *et al.*, 1986; Ben-Ze'ev 1987)。細胞骨格に参与するこれらの遺伝子の発現の変化は、排卵後の細胞分化時にみられる顆粒膜細胞の急激な形態変化に直接関与しているものと考えられている。

本研究の目的

これらの豊富な情報に支えられた顆粒膜細胞は、ステロイド産生制御、(黄体への)細胞分化あるいは卵母細胞の減数分裂抑制維持/解除などの機構を解析するために優れた実験系であり、これまでの結果は、それらの挙動が卵胞/黄体成熟の各ステージにおいて時期特異的発現を示す遺伝子にコードされる酵素や因子の作用と密接に共役していることを示している。しかしながら、これまでの知見はおもに特定のホルモンや生理活性物質についての生理学的あるいは組織学的なアプローチを通して得られたものが多く、分子生物学的な手法による異なった観点からのアプローチ(解析)が待たれている。

本研究では卵胞にみられる諸反応を分子レベルで理解する第一歩として、その中心的役割を担っている顆粒膜細胞に焦点を当て、卵胞の発育および黄体の発達過程において時期特異的に発現する遺伝子を単離するとともに、それらの産物が果たす機能についての検討を加えた。つぎに、顆粒膜細胞の遺伝子発現およびその産物の機能についての解析をより詳細に行うために、外来遺伝子を導入することにより安定でしかも初代顆粒膜細胞の形質を保持した顆粒膜細胞株を樹立し、それを用いた*in vitro*培養系を設定した。

さらに、この培養系を利用して、顆粒膜細胞の卵母細胞に対する減数分裂抑制活性を測定する可能性を検討した。

材料と方法

<顆粒膜細胞及び黄体>

培養顆粒膜細胞の調製のためには、屠殺場において、性周期が始まる前の未成熟ブタ(5-10ヶ月齢)から卵巣を取り出し、氷冷したHanks balanced salt solutionに入れ、研究室に持ち帰った。組織切片やRNA調製に用いる場合は、ブタ成獣より採取した卵巣を直ちに液体窒素で凍結した。黄体は凍結前に卵巣から分離し、各ステージごとに分けた。その際、黄体周囲を包んでいる皮膜は除去した。

<卵巣の組織切片像>

卵巣及び各ステージの黄体は、単離後すぐにブアン液(ピクリン酸飽和溶液:ホルマリン原液:氷酢酸=15:5:1 vol/vol)で一晩固定し、ハードパラフィンに包埋、5 μ mの薄切切片を作成した。切片はMasson-Goldner法(Goldner *et al.*, 1938)により染色して観察した。

<RNA調製のための試薬・器具>

RNAの調製試薬は、トリス緩衝液を含むもの以外はすべて最終濃度0.2%になるようにDEPC(Diethylpyrocarbonate)を加え、激しく攪拌した後オートクレーブ処理することによりRNaseフリーとした。DEPC処理の不可能なものについては、RNaseフリーにした器具と未開封の試薬を使用した。

器具は、乾熱滅菌が可能なものについては、180℃で9時間の処理を行ないRNaseフリーとした。その他のものについては、0.2% DEPCで処理した後、オートクレーブにかけ、RNaseフリーとした。

<RNAの調製>

Guanidinium Method(Frederick *et al.*, 1987)で行った。

i) 顆粒膜細胞:凍結状態の卵巣を、卵胞液が解け出すまで室温に放置した。解凍した卵胞から直ちに20G針付き1mlシリンジで卵胞液ごと顆粒膜細胞を集めた。なおシリンジには、予め200 μ l程度のグアニジン溶液(4M guanidinium isothianate, 20mM sodium acetate pH5.2, 0.1 mM DTT, 0.5% N-lauryl sarcosine)をいれておき、集めた顆粒膜細胞が直ちに溶けるようにした。溶出液を1つの容器に集め、後述の操作を続行した。

ii) 黄体:凍結した黄体、4-6個をすばやくシールバックに入れ、氷冷したグアニジン溶液を必要量だけ加えた後、シールした。黄体が解凍しない内に、木づちなどを用

いて紛壊し、遠心可能な別の容器に移した。3,000 rpm で10分間遠心し、溶け残った細胞を除去した後、上清を新しい容器に移した。上清が均一な溶液になるまでこの操作を繰り返した。

i) あるいは ii) で集めた溶出液を20-G注射針に数回通し、必要がある場合には再び5,000 rpmで10分間、遠心分離を行った。溶液をCsCl 溶液 (5.7M CsCl in 0.1mM EDTA) 上に、1.5:7.0 (容量) になるように重層し、SW-41Ti ローター (Bechman) で26Krpm, 21時間、または、SW-50.1 ローター (Bechman) で35Krpm, 20時間遠心した。遠心終了後、液層を静かに除去し、超遠心管の壁に残っている余分なCsCl 溶液を除いた。超遠心管の底部に沈澱しているRNAを、360 μ lのTES 溶液 (10mM Tris·Cl pH7.4, 5mM EDTA, 1%SDS) に溶かし、エッペンチューブに移した。溶液をクロロフォルム/ブタノールで抽出した後、2.5倍量のエタノールでRNAを沈澱させた。沈降物を200 μ lのDEPC処理蒸留水にとかし、吸光度でその収量をはかり、またホルマリンゲルを使用して分解程度のチェックをおこなった。RNAは、最終的に2.5倍量のエタノールを加えた後、-70℃で保存した。

顆粒膜細胞株に関してはISOGEN (ニッポンジーン) を用いて全RNAを調製した。

<ライブラリーの作成>

黄体ライブラリー: 種々のステージの黄体より調製した全RNAから、mRNA purification Kit (Pharmacia) を用いてpoly(A)⁺RNAを分離した。これと相補的なcDNAを、cDNA 合成キット (Pharmacia) を用いて合成し、Lambda gt11 ベクターのEcoRI 部位につないだ。リガーゼ反応は12℃で一晩行った。組み換えLambda phage DNAを、GIGAPACK GOLD PACKAGING EXTRACT (Stratagene) を使用してパッケージングし、定量の後、150mmシャーレ1枚あたり約5×10⁴プラークがでるように調製した。E.coli Y1088を宿主として、計5×10⁵個の組み換えファージを感染させ、37℃で約8時間保温した。プラークが1mm程度の大きさになった時点で、10-20mlのSM 液 (5.8g NaCl, 2.0g MgSO₄, 50ml 1M Tris-HCl pH7.5, 5ml 2%gelatin / 1 liter) を重層し、穏やかに揺らしながら4℃で一晩放置した。その後、ファージを含んだSM液を回収し、3,000 rpm程度で軽く遠心分離して大腸菌を除いた。これをcDNAライブラリーのストックとして4℃で保存した。

顆粒膜細胞ライブラリー: 顆粒膜細胞より調製した全RNAを用いて、黄体ライブラリーと同じ操作を行って作成した。

<Differential hybridization>

黄体特異的なcDNAクローン: 黄体より調製した poly(A)⁺ RNA 2 μ g におよそ700 ngのランダムプライマーを加え、計10 μ lにした。70℃で3分間保温した後 42℃に移し、10

μ lの反応液 (10 x 緩衝液 2 μ l, 100 μ M dA, dG, dC, dT Mix 1 μ l, RNasin 100units, α -³²PdCTP 0.05mCi, 逆転写酵素 20-40units) を加えた。これを42℃で30分保温し、標識したプローブ(+プローブ)を作成。一方で、顆粒膜細胞から同様の手順で(-)プローブを調製した。

黄体ライブラリーより、90mmシャーレに、10³プラーク以下になるように組み換えファージをまき、そこからニトロセルロースメンブレンに二枚のレプリカを取った。それぞれのメンブレンに対して(+)プローブ、(-)プローブを 42℃ でハイブリダイズさせ、(+)プローブでシグナルがあり、(-)プローブでないものを回収した。

回収したプラークは100-300 μ lのSM 液に搅拌し、4℃で保存した。

顆粒膜細胞特異的なcDNAクローン: 顆粒膜細胞と黄体を入れ換えて上記と同様の操作を行った。

<Modified plaque hybridization>

径90mmのNZYプレートに、300 μ lのE.coli Y1088 (O.D=約0.5)を、3mlのソフトアガロースとともに重層し、クリーンベンチ内で1.5時間、ゲルの表面を乾かした。

Differential hybridization により単離した組み換えファージのSM液を、その上に一滴 (2-10 μ l: 滴下した部分全面が完全に溶菌する量) 滴下し、37℃で一晩保温した。

5-10mmの巨大プラークができたところで、ニトロセルロースメンブレンを用いて、一枚のシャーレあたり2枚のレプリカをとった。一枚は顆粒膜細胞プローブを、もう一枚は黄体プローブを用いて、

Differential hybridization と同じ条件でハイブリダイゼーションを行った。

<Northern hybridization>

顆粒膜細胞、黄体の3つのステージ(初期の黄体、開花期の黄体、白体)、および前立腺より調製した全RNAをそれぞれ10 μ gずつ使用した。電気泳動緩衝液としてMOPS/EDTA 溶液 (X10:0.2M MOPS, 50mM sodium acetate, 10mM EDTA pH 7.0) を使用した。RNAはエタノール沈澱の後、2.5 μ lの25mM EDTA - 0.1%SDSに溶解し、12.5 μ lの Electrophoresis sample buffer (0.75ml deionized formamide, 0.15ml 10×MOPS, 0.24ml formaldehyde, 0.1ml deionized RNase-free H₂O, 0.1ml glycerol, 0.08ml 10% (W/V) blomophenol blue) を加え、65℃で15分間保温した。保温終了後、1.0mg/mlのethidium bromide溶液を0.5-1.0 μ l加え、1.2%のホルマリンゲルで 20V 7mA 17時間電気泳動を行った(Fourney *et al.*, 1989)

メンブレン (Immobilon-N, Millipore) への転写には、Posi Blot PRESSUR BLOTTER

(Stratagene)を用いた。

Differential hybridization で得られたクローンを、PCR法を用いて増幅した後、Random primer DNA ラベリングキット (Takara)を用いて³²P- 標識したプローブを用意した。プローブはG-50 Quick Spin Column (Boehringer Mannheim) で精製し、メンブレン一枚に対し全反応液の100分の1を用いた。ハイブリダイゼーションは42℃で一晩行い、メンブレンの洗いはLow stringency buffer (2×SSC, 0.1% SDS)を用いて3回 (室温、10 秒1回、10分間 2回)、および High stringency buffer (0.2×SSC, 0.1% SDS) で2回 (室温、10 秒1回、15分間 1回)行った。洗いは、サーベイメーターを用いてメンブレンの様子をみながら行い、カウントが150cpm前後になったところで中止し、オートラジオグラムをとった。

<RACE法>

TS507cDNAクローンの5'末端を決定するために、RACE法 (Frohman, 1990) を行った。1μlのTS507-1 primer (5' CCTCTCAGGCTGAGAGCTCT 3', 10 OD) と、黄体より調製した1μgのpoly(A)⁺ RNAを12 μlのRNase フリーの蒸留水に溶解し、70℃で10分間保温した。氷中で急冷後、4μlの5X 緩衝液 (0.25 M Tris-HCl (pH8.3), 0.375 M KCl, 15mM MgCl₂)、2μlの0.1 M DTT, 1μlのdNTP Mix (各10mM) を加え、45℃で2分間保温した。200unitsのSuper Script Reverse Transcriptase (BRL) を加え、穏やかに攪拌した。45℃で1時間保温した後、4μlの0.5M EDTAを添加し、反応を終了させた。フェノール/クロロホルムで処理した後、1/10量の3M酢酸ナトリウムを加えて、エタノール沈殿を行った。沈殿を6.8 μlの蒸留水に溶解し、95℃で2分間加熱した。氷中で急冷後、12.5 μlのTdT 2X MnCl₂ 液 (200 mM カコジル酸ナトリウム (pH7.2), 2 mM MnCl₂, 0.1mM DTT)、5 μl (25 units) のTerminal Transferase、0.7 μlの20mM dCTPを添加し、37℃で30分間保温した。65℃で5分間保温することによって酵素を失活させた後、フェノール/クロロホルム処理とエタノール沈殿を行った。1μlのTS507-2 primer (5'TTATAATACCCTACCTGTGAC 3', 10 OD) と1μlのdG primer (12-18mer, 10 OD) を用いて、アニーリング温度52℃で40サイクルのPCRを行った。産物を制限酵素で処理した後pUC19に組み込み塩基配列を決定した。

<免疫染色>

ペルオキシダーゼ標識 抗ウシ・コラゲナーゼインヒビター抗体(Clone 7-6C1, 富士薬品工業)を用いた直接法により、免疫組織化学的染色を行った。

卵巣組織(卵胞と黄体)は採取した後、直ちに液体窒素で凍結し、低温室で厚さ7μmの凍結切片を作成した。薄切後は、室温で約30分間風乾し、冷アセトン (4℃) で

固定した。凍結切片の免疫染色は Vectastain ABCkit (Vector Laboratories Inc.) および Horseradish-peroxidase (HRP) の基質である3,3'-Diaminobenzidine-4HCl (DAB) を用いたABC法 (Hsu *et al.*, 1981) により行った。

またヘマトキシリンにより核染色を施し、光学顕微鏡用観察標本とした。(×190)

<Digoxigenin染色>

免疫染色と同様に液体窒素で凍結したブタ成熟個体の黄体を7 μmの凍結切片とし、薄切後65℃で1-2時間乾燥した。固定は4% PFA (paraformaldehyde) /PBSで行い、固定後、3×PBSで5分2回、および1×PBSで5分1回、室温で洗浄を行った。アルコール上昇系列による脱水後、風乾させた。固定、乾燥後、組織中のmRNAを露出させるために、切片を0.3% Triton X-100/PBSで10分間処理し、さらに2mg/mlのグリシン/PBSで15分間の処理を室温で行った (村松と岡山, 1991)。引き続き、組織内の塩基性タンパク質をアセチル化するために、0.1M Tris-HCl, pH8.0 : 氷酢酸 = 400:1の混合液で10分間の処理を室温で行った。PBSによる洗浄後、アルコール上昇系列により脱水し、風乾させた。

プレハイブリダイゼーションは、風乾した組織を室温において2×SSCで10分間処理した後、ハイブリダイゼーション溶液 (4XSSC, 50%Formamide, 1XDenhardt's, 10%Polyethylene Glycol, 0.5mg/ml Sonicated Salmon Sperm DNA, 0.25mg/ml Yeast tRNA, 1mM DTT, 1U/μl RNase Inhibitor) を用いて、室温で1時間行った。

DIG標識プローブの作成は、300ngのTS507cDNAをテンプレートとし、Nonradioactive DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim) を用いて、RNase フリーの条件下で行った。熱変成したDIG標識プローブを最終濃度100pg/μlになるようハイブリダイゼーション溶液に添加し、プローブ溶液を調製した。ハイブリダイゼーションは、このプローブ溶液をスライド1枚あたり70μl滴下し、シリコンコートしたカバーガラスをかけて、50%Formamide/0.3M NaClで飽和した37℃の湿潤箱中で一晩行った。

反応終了後は、カバーガラスを除去し、2xSSCにより、室温で1時間を2回、1xSSCにより室温で1時間1回、および、0.5XSSCにより37℃で30分1回の洗浄を行った。Buffer 1 (100mM Tris/HCl pH7.5, 150mM NaCl) により軽く洗浄した後、ブロッキング溶液 (2%正常ヒツジ血清、0.3% Triton X-100/Buffer 1) により室温で30分間処理した。ブロッキング処理後、スライド1枚あたりに150-200μlの希釈AP (Alkaline Phosphatase) 標識DIG抗体溶液 (AP標識DIG抗体を1%正常ヒツジ血清、0.3% Triton X-100/Buffer 1で1:500に希釈したもの) を滴下し、蒸留水で飽和した湿潤箱中において室温で2時間反応させた。反応終了後、室温におけるBuffer 1による15分間2回の洗浄と、Buffer 3

(100mM Tris-HCl pH9.5, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂) による2分間の平衡後、スライド1枚あたり150 μ lの発色溶液 (1mlのBuffer 3に4.5 μ lのNBT (Nitroblue Tetrazolium) 溶液および3.5 μ lのXリン酸 (5-bromo-4-chloro-3-inodolyl phosphate) を添加したもの) を滴下し、カバーガラスをかた。サンプルを遮光し蒸留水で飽和した湿潤箱中において、室温で一晩反応させた。

発色後は、カバーガラスをはずし、TE緩衝液pH8.0で反応を停止後、蒸留水で洗浄し、メチルグリーン溶液により核染色を施した。アルコール上昇系列により脱水後、風乾して水溶性の封入剤であるグリセロールゼラチン (Sigma) を用いて封入し、光学用標本とした。

<顆粒膜細胞株の作成>

屠場で採取したブタ未成熟個体の卵巣を氷中に保存し輸送した。卵巣を氷令したHanks'+PSF溶液 (Penicillin: 50U/ml, Streptomycin: 50 μ g/ml, Fungizone: 5 μ g/ml) で3回洗浄した後、26Gの注射針を用い、顆粒膜細胞を5mlのHanks'+PSF溶液に採集した。TS-7ローター (トミー) を用いて500回転、3分間の遠心分離を行い、上清を捨てた。新たに5mlのHanks'+PSF溶液を加え、沈殿をほぐした後、2,000 rpmで10分間の遠心分離を行い細胞を洗浄した。この洗浄をさらに3回行った後、5mlのHanks'+PSF溶液に懸濁した。35mmシャーレを用い、8%の血清と抗生物質 (PSF) を添加したDulbecco's modified Eagle Medium (DEM, GIBCO) に1.7 $\times 10^5$ の細胞を加え、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂で10日間培養を行った。容器の底に70-80%まで増殖した細胞に対し、5 μ gのpEF-Src Neo (EF promoter に v-src 遺伝子をつないだもの。マーカー遺伝子としてSV40 初期プロモーターにつないだネオマイシン耐性遺伝子を持つ)、または2 μ gのpEF321T Neo (pEF-Src Neo のsrc部分をSV40 large T抗原で置き換えたもの。) と5 μ gのpNCO202 (Dexamethasone-inducible MMTV-LTR プロモーターにヒトメラノーマ由来H-ras遺伝子をつないだもの) をリボソームを用いてトランスフェクションした (Bothwell et al., 1990)。3日後培地を選択培地 (上記のDEM培地にNeomycin:1mg/mlを添加したもの) に交換、以後2日おきに培地を交換し、Neomycin耐性の細胞を選択した。生き残った細胞はマイクロピペットを用いて単離し、24穴のシャーレで増殖させた。充分増殖した後、Trypsin-EDTA緩衝液 (0.05% Trypsin, 0.04% EDTA) を用いて細胞を集め、液体窒素中に保存した。

<免疫沈降>

培地に³⁵S-Metを添加して細胞中のタンパク質を³⁵S-標識した後、RIPA緩衝液 (50mM Tris-HCl(pH7.4), 150mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5% NP40, 1mM Na-Orthovanadate, 1mM NaF, 1% Aprotinin, 1mM Phenanthroline, 5mg Pepstein, 10mg Leupiptin, 0.5mM PMSF, 15%

Glycerol) を用いて細胞の抽出液を得た。300 μ lの細胞抽出液に希釈した抗v-src抗体、または抗v-H-ras抗体を5 μ l添加し、氷中で1時間以上放置した。RIPA緩衝液または10%Glycerolで1/2に希釈したProtein A-Sepharoseを20 μ l加え、緩やかに攪拌しながら4 $^{\circ}$ Cで1時間以上保温した後、4 $^{\circ}$ C、5,000-10,000 rpmで3秒間遠心分離を行った。上清を除き、1mlのRIPA緩衝液を加え緩やかに攪拌した。先程と同条件で遠心分離を行い、沈殿を洗浄した。この洗浄をさらに2回行った後、1mlのHEPES-10%Glycerol溶液に懸濁した。10 μ lのサンプルに等量の2X Sample 緩衝液 (62.5mM Tris-HCl (pH 6.8), 3% SDS, 10% Glycerol, 100mM DTT) を加え95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱した後、氷中で急冷した。4 μ lの電気泳動緩衝液 (0.25% Bromophenol Blue, 0.25% Xylene Cyanol, 30% Glycerol) を加え、SDS-PAGEを行った。

<自己リン酸化反応>

³⁵S-Metを含まない培地で培養した細胞に対し、免疫沈降と同様にしてsrcタンパク質およびrasタンパク質を得た。これらの沈殿物を15 μ lのキナーゼ反応液 (50mM Hepes (pH7.4), 10mM MnCl₂, 10% Glycerol, 0.1-10.5 μ M γ -³²P-ATP) に溶解し、25 $^{\circ}$ Cで10分間保温した。等量の2X Sample 緩衝液を加え95 $^{\circ}$ Cで3分間加熱した後、氷中で急冷した。4 μ lの電気泳動緩衝液を加え、SDS-PAGEを行った。

<cAMP濃度の検出>

60mmシャーレを用いてSlot Hybridizationと同様にして細胞を準備した。ただし、LHを添加した場合のみ、LH添加後100分で次の操作を行った。サンプルの調製は基本的にCicirelliらの方法に従った (Cicirelli, 1985)。

培養液：細胞培養の終了した培地から300 μ lをマイクロ試験管に分注し、そこに氷冷したエタノールを700 μ l加えた。1200xgで5分間冷却遠心を行った後、上清を別のマイクロ試験管に移し凍結乾燥を行った。2mlの0.1M酢酸ナトリウム溶液にサンプルを溶解し、100 μ lを測定に使用した。

細胞：培地を吸引により完全に除去した後、1mlの氷冷した70%エタノールを加え細胞を破壊した。ラバーポリスマンを用いて抽出液を回収し、マイクロ試験管に移した。1200xgで5分間冷却遠心分離を行った後、上清を別のマイクロ試験管に移し凍結乾燥を行った。0.1M酢酸ナトリウム溶液にサンプルを溶解し、100 μ lを測定に使用した。

cAMP濃度の測定には、Non-Isotopic Immunoassay System for cAMP (BRL) を用いた。

<タンパク質量の測定>

細胞のcAMP濃度の測定の際、冷却遠心分離の過程で得られた沈殿物を風乾した後、

TSSD溶液 (10mM Tris-HCl (pH7.4), 0.15% SDS, 50mM NaCl, 10mM DTT) を加えた。充分に攪拌した後、1500回転で5分間遠心分離を行い、上清を別のマイクロ試験管に移しタンパク測定用のサンプルとした。

タンパク質の定量には Protein Assay (Bio Rad) を用い、ブラッドフォード法 (Bradford, 1976; Pilgrim, 1977) で行った。

<卵母細胞の調製、培養条件など>

フィーダーレイヤーの準備: 35mmシャーレに199/HEPES/G培地 (10% Inactivated Fetal Calf Serum, 25mM HEPES, 0.225% NaHCO₃, 40 μ g/ml Gentamycin, pH7.2-7.4) を用いて初代培養顆粒膜細胞または顆粒膜細胞株を準備した。培養開始の翌日に培地を一度交換し、その後さらに5日間培養を行い、容器の底に90-95%まで増殖した時点で卵母細胞を加えた。

卵母細胞の調製: 屠場よりブタ卵巣を30-35℃に保温したHanks'+PSF溶液中に入れて輸送した。保温したHanks'+PSF溶液で3回洗浄した後、卵巣を35℃のHanks'溶液中で保温した。以後の操作は、無菌的に、常に30-35℃に保温した状態で行った。ホットプレート上で、22Gの注射針を用いて3-5mmの卵胞から卵母細胞を調製した。この際、卵巣3個から得た卵母細胞を3mlの199/HEPES/G培地を入れた試験管1本に集めた。試験管を5分間静置し、卵母細胞を沈殿させた。パスツールピペットを用いて卵母細胞を約500 μ lの培地ごと吸い取り、10mlの199/HEPES/G培地に移した。5分間静置して得た沈殿層を同様の方法で時計皿に移し、顕微鏡下で観察しながら卵丘細胞のついた卵母細胞のみをマイクロピペットを用いて集めた。集めた卵母細胞を1mlの培地を満した別の時計皿に移し、さらに洗浄した。マイクロピペットで卵母細胞を回収し、フィーダーレイヤーを含むシャーレに均等に分配した。

一度の実験について卵巣約20個を用い、卵巣が個体を離れてから5時間以内に以上の操作を終えた。

卵母細胞の固定: フィーダーレイヤーに卵母細胞を加えた状態で、37℃、5%CO₂で25時間保温を行った後、マイクロピペットを用いて卵母細胞を集めた。培養時間終了後に卵丘細胞を失っていた卵母細胞はこの際に除去した。400 μ lのTrypsin-EDTA緩衝液を含むマイクロ試験管に卵母細胞を移し、ボルテックスを3分間行って卵丘細胞を完全に除去した後、3,000 rpm で30秒の遠心分離を行った。ピペットマンを用いてマイクロ試験管の底から200 μ lのTrypsin-EDTA緩衝液ごと卵母細胞を回収し時計皿に移した。マイクロピペットを用いて顕微鏡下で卵母細胞を集め、スライドガラス (厚さ0.8-1.0mm、白縁磨: MATSUNAMI) に移した。カバーガラスをかけ卵母細胞が動かないよう注意しながら静かに固定溶液 (エタノール/酢酸=3/1) に沈めた。この状態

で2日-7日間固定を行った後、スライドガラスを固定液から引き上げ、カバーガラスの片側からアセトオルセインをしみこませ、核染色を行った。充分染色した後、アセトグリセロール (グリセリン/酢酸/水=1/1/3) をしみこませて脱染色を行い、カバーガラスの周囲を封入した。

顕微鏡下の観察の結果、核や細胞質の状態などから判断して良好な卵母細胞のみを計測した。また良好な卵母細胞の割合が60%を下回った場合にはそのサンプル全体の計測を中止した。同じ実験を複数回行い (合計937個の卵母細胞を計測した)、各実験で得られたGVBD%の値の平均をとり結果とした。

<スロット・プロット>

初代顆粒膜細胞は調製した後、100mmシャーレを用い、8X10⁶ cellsを5%血清を添加したDEM/F12(1:1)培地で、37℃、5%CO₂で24時間培養した。Hanks'溶液で血清を充分洗浄した後、ホルモンなどで遺伝子発現の誘導をするために無血清培地 (D-MEM/F12 (1:1), Insulin 2 μ g/ml, Transferrin 5 μ g/ml, Hydrocortison 40ng/ml; Orly *et al.*, 1980) に変更した。無血清培地にはFSH (porcine, 100NIH-FSH-SI U/mg)、またはForskolinを、それぞれ最終濃度25ng/ml、50 μ Mになるように添加し、48時間培養を続けた。FSH、またはForskolinを添加した細胞はこの培養時間終了後、直ちにIsogen (ニッポンジーン) を用いて全RNAを調製した。

LH (ovine, 2-3 NIH-LH-SI U/mg) は、FSHを添加して48時間の培養を終了した細胞をHanks'溶液で洗浄した後、最終濃度1ng/mlになるように添加、さらに24時間培養を続けた。培養時間終了後、直ちにIsogenを用いて全RNAを調製した。

顆粒膜細胞株は5%血清を添加したDEM/F12(1:1)培地を用いて、37℃、5%CO₂で100mmシャーレの底に80%程度になるまで増殖させた後、0.05% Trypsin-0.04% EDTA溶液で一度回収した。細胞を100mmシャーレの底に30%程度になるようにまき直し、5%血清を添加したDEM/F12(1:1)培地で48時間培養した後、Hanks'溶液で血清を充分洗浄した。Srcを導入した細胞株に関しては、初代顆粒膜細胞と以後同様の手順で操作を行った。SV40LargeT 抗原遺伝子とH-ras遺伝子を導入した細胞株に関しては、無血清培地にHydrocortisonを添加せず、必要に応じてDexamethasoneを最終濃度1 μ Mになるように添加し用いた。以後初代顆粒膜細胞と同様の操作を行った。

調製した全RNAを0.5 μ g または0.1 μ g 分取し、DEPC処理した水10 μ lに溶解した。29 μ lの反応溶液 (100%Formamide 20 μ l, 37%Formaldehyde 7 μ l, 20XSSC 2 μ l) を加えた後、68℃で15分間保温し、続いて氷上で急冷した。そこに78 μ lの20XSSCを加え、全量をプロッティングの装置にのせた。PVDFメンブレン (Millipore) を用い、メンブレンに傷を付けないよう注意しながら水流ポンプで緩やかに吸引した後、真空状態で80℃、2時間加熱した。

プローブはNorthern Hybridizationと同様に準備し、一回に全反応液の300分の1を使用した。ハイブリダイゼーションは45℃で一晩行い、メンブレンを Northern Hybridization と同様に洗った。

結果

第一部：時期特異的に発現する遺伝子の単離および解析

<卵巣の調製と顆粒膜細胞>

調製した卵巣の染色による組織像を示す(図2)。緑色に染まっている部分はライトグリーン染色部分で結合組織を、また赤い部分はボンソーの酸性フクシン染色部分で、卵胞では顆粒膜細胞、黄体では黄体実質細胞をそれぞれ示している。

顆粒膜細胞は図2aの矢印で示すように卵胞周囲に配列しており、卵母細胞の存在する部分ではギャップ結合によりつながっている。図2bは、排卵直後の初期の黄体を示す。排卵に伴って顆粒膜細胞が分化増殖を開始して黄体細胞となり、数の面でも大きさの面でも増加している様子が観察できる。また、この際起こる、結合組織の黄体細胞間への進入も観察される。黄体細胞はさらに増殖を続け、内腔を埋め尽くしている(図2c)。図2dの白体期では、全体が緑色に染まり、結合組織より構成されていることがわかる。

<cDNA ライブラリーの作製と Differential hybridization によるスクリーニング>

顆粒膜細胞ライブラリー、黄体ライブラリー、それぞれ 5×10^4 - 1×10^5 プラークに対して Differential hybridization を行った結果、顆粒膜細胞特異的と思われるものを約100 クローン、また黄体特異的と思われるものを約50 クローン得ることができた。

<Modified Plaque Hybridization>

Differential hybridization により得られた組み換えファージに対して、発現の差を簡便な方法で明確にするために、Modified plaque hybridization を行い時期特異的な発現をさらに確認した(図3)。顆粒膜細胞側でみられるシグナルは黄体細胞側でみられるものと比べて弱い。この原因は、顆粒膜細胞由来のRNAがやや分解していたため、そこから合成したcDNAのサイズがインサート、プローブ共に黄体の場合と比較して小さかったことが原因であると思われる。

この結果、顆粒膜細胞側と黄体側の間でシグナルに顕著な差が確認されたものについてさらに解析を進めた。

<Northern hybridization による発現時期の解析>

Differential hybridization および Modified plaque hybridization により得られた cDNA クローンの発現の時期特異性に関してさらに詳しい情報を得るために、顆粒膜細胞(図2a矢印)、初期の黄体(図2b)、開花期の黄体(図2c) および白体(図2d) よりそれぞれ調製した全RNAを用いて Northern hybridization を行った。その結果、特

に顕著なステージ特異性を示した5種のクローンをとりあげ(図4)、以下の実験へと進んだ。

<各クローンの発現時期と塩基配列の解析および遺伝子産物の予測>

クローン TS543: このクローンに対応する mRNA は初期の黄体および開花期の黄体に特に強い発現を示す(図4a)。TS543の塩基配列を決定し(図5)データベースでの検索を行ったところ、ウシ・コラゲナーゼインヒビター(Freudenstein *et al.*, 1990)と、DNA レベルで90%、またアミノ酸レベルで88%のホモロジーが認められた(図6)。単離した TS543 cDNA の全長(約700塩基対)をプローブとして Northern hybridization をおこなった場合、黄体のレーンでバンドがブロードまたは複数存在しているように現れた(図7b)。この転写産物の正確なサイズを確認するために、クローンの3'末端側から遡って、およそ200塩基対の領域についてPCR法によりプローブを調製した。図4aはこの3'末端の断片をプローブとして行った Northern hybridization の結果である。

クローン TS507: 排卵後の3ステージではほぼ等しい発現がみられる(図4b)。このcDNAクローン(TS507)の一次構造の決定しORFを検索したところ開始コドンを含む5'末端領域を欠いていると思われたため、RACE法(Frohman *et al.*, 1990)によりさらに上流域をcDNAクローン化し、全塩基配列を決定した(図8a)。IDEASを用いてデータベースとホモロジー検索を行った結果、ヒト Prostatic Secretory Protein (PSP)(Kohan *et al.*, 1986; Mbikay *et al.*, 1987)に対し、DNAレベルで67%、アミノ酸レベルで54%のホモロジーが確認された(図9)。

クローン TS537: 1.8kbと0.5kbの2種類のmRNAが確認された(図4c)。1.8kbのシグナルでは排卵後の3ステージで共に発現量が多く、0.5kbのシグナルでは白体期での発現が多くみられた。このことから、同じ塩基配列を含み大きさの異なる二種のmRNAが存在していることが予想された。このcDNAクローン(TS537)はウシ・ミトコンドリア ATPase protein 6(Anderson *et al.*, 1982)とDNAレベルで73%のホモロジーが確認された(図10a)。またそれから予想されるアミノ酸配列とウシ・ミトコンドリア ATPase protein 6タンパク質との間でホモロジー検索を行った結果では65%、またヒト・ミトコンドリア ATPase protein 6(Anderson *et al.*, 1982)に対しては71%のホモロジーが認められた(図10b)。

クローン TS049: このクローンに対する mRNA として、1.8kb、0.9kb、0.7kbの位置にそれぞれシグナルが確認された(図4d)。1.8kbの位置のシグナルは顆粒膜細胞では発現量がごく少なく、黄体のステージが進むに従って量が増加している。0.9kbのシグナルは開花期の黄体でその発現量が多くなり、顆粒膜細胞では比較的少ない。0.7kbのシグナルは開花期の黄体と白体で発現量が上昇している。この

cDNAクローン(TS049)の一次構造の決定を行い、データベースとホモロジー検索を行った結果、ウシ・ミトコンドリア cytochrome oxidase subunit II(Anderson *et al.*, 1982; Young and Anderson, 1980)にDNAレベルで79%(図11a)、アミノ酸レベルで94%のホモロジーが確認された(図11b)。

クローン TS052: 顆粒膜細胞のレーンに特に強い発現がみられる(図4e)。データベースとのDNAホモロジー検索の結果、ブタ・インヒビン α -サブユニット(Mayo *et al.*, 1986)と98%のホモロジーが認められた(図12)。

<コラゲナーゼインヒビターの免疫組織学的検出>

図4aに示した Northern hybridization と図6のホモロジー検索の結果から、クローン TS543はブタのコラゲナーゼインヒビター遺伝子に相当すると考えられた。そこで、その遺伝子産物の黄体での生理機能について検討するために *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。

図4aに示した Northern hybridization にみられるように、TS543(Porcine collagenase inhibitor)の発現は、mRNAレベルで観察する限り、黄体期、特に黄体としての機能が強い開花期にそのピークが認められた。そこで次に、その翻訳産物の局在部位を知るために、抗コラゲナーゼインヒビター抗体を使用して免疫組織化学的染色を行った。図13は、開花期の黄体での結果を示す。

インヒビターは、血管周囲の結合組織部分や黄体細胞間(図13a矢印部分)、また、基底部の結合組織(図13b)に局在している。一方、顆粒膜細胞では有為なシグナルは観察されなかった。

<TS507の発現組織の分析>

黄体期特異的な発現を示す TS507 はデータベースでの検索の結果、雄性組織である前立腺の分泌タンパク質(PSP)にホモロジーを持つことがわかったため(図9)、TS507の雌性生殖組織での機能に興味を持たれた。そこで、TS507の雌性組織、特に黄体組織内での発現部位を調べるため、DIG標識したDNAプローブを用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。開花期の黄体において黄体実質細胞にシグナルを確認した(図14)；特に血管周囲の黄体細胞ではより強いシグナルが観察できる(図14b矢印)。つぎに、この"TS507"遺伝子がPSP同様、前立腺でも発現しているかどうかを知るために、ヒト poly A⁺ RNA を用いて Northern hybridization を行ったが、前立腺、精巣、卵巣のいずれにも発現がみられなかった(図15)。さらにブタの前立腺での発現も調べたが、発現は確認されなかった(図16)。

第二部：顆粒膜細胞株の樹立：その特性と減数分裂抑制活性

<薬剤耐性細胞株の単離と導入遺伝子の発現について>

薬剤耐性と継代培養により選択したいくつかの細胞群について、導入した発ガン遺伝子の発現を調べた。まず、抗 H-ras 抗体または抗 v-src 抗体を用いて免疫沈降を行ない、それぞれのタンパク質を検出した（図 19）。抗 H-ras 抗体を用いた場合、ras 遺伝子を導入した LT/H-rasB1、LT/H-rasD の細胞株で、p21^{ras} の位置にシグナルが確認された（図 19 左）。また抗 v-src 抗体を用いた場合では、src を導入した細胞株で強いシグナルが確認された（図 19 右）。このことより導入した発ガン遺伝子は顆粒膜細胞株中で発現していることが確認された。

さらに、v-src を導入した顆粒膜細胞株での src タンパク質の活性を知るために、その自己リン酸化反応を調べた（図 20）。図の矢印の位置に見られるように v-src を導入した細胞株で特異的に自己リン酸化のシグナルが確認された。一方、内在性の c-src によるシグナルは見られなかった。

<顆粒膜細胞株の形態について>

樹立した顆粒膜細胞株の形態は、v-src を導入したものと LT/H-ras を導入したものの間で違いがみられた（図 18）。v-src を導入した細胞株（SrcA: 図 18 A、B; SrcB: 図 18 C、D）では、十分に増殖する以前は培養開始当初の初代顆粒膜細胞（図 17 B）に形態が似ているが初代顆粒膜細胞ほど細胞が大きくなり（図 18 A、C）、従って容器の底に一杯になった状態も様子がやや異なる（図 18 B、D）。一方、LT/H-ras を導入した細胞（LT/H-rasB1: 図 18 E、F; LT/H-rasD: 図 18 G、H）では十分に増殖する以前から、初代顆粒膜細胞が増殖したときにみられる全体に細長い形態を示す（図 18 E、G、図 17 C、D）。細胞が容器の底一面に増殖した状態は初代顆粒膜細胞に比較的近いようである（図 18 F、H）。しかし、これらの細胞株では容器の底一杯になった後、所々から粒子状の細胞が盛り上がっている状態が見られ、初代顆粒膜細胞とは異なる。

<ホルモンまたは薬剤による cAMP 濃度の変化>

ゴナドトロピン、または cAMP のホモログ（dbcAMP）、細胞内のアデニレートシクラーゼを活性化する薬剤（Forskolin, Cholera toxin）などで初代顆粒膜細胞を刺激することにより cAMP 濃度が上昇し、プロゲステロンなどステロイドホルモンの産生（Knecht and Catt, 1983; Richrds *et al.*, 1987; Hsueh *et al.*, 1984; Demeter-Aolotto *et al.*, 1993）、LH レセプター（Goxe *et al.*, 1992; Hsueh *et al.*, 1984）、細胞骨格タンパク質（Ben-Ze'ev and Amsterdam, 1987）などの発現が増加すると報告されている。また細胞内の cAMP

濃度の上昇により見られるこれらの産物の発現が顆粒膜細胞としての特徴の 1 つであると考えられている。これらの知見から、ゴナドトロピンまたは薬剤処理による顆粒膜細胞株内部の cAMP 濃度の上昇が顆粒膜細胞としての性質を保っているかどうか知るための第一番目の指標になると考えられる。

樹立した顆粒膜細胞株を FSH、LH または Forskolin により刺激し、細胞内の cAMP の濃度変化を計測した。この際、細胞培地内の血清はホルモンによる刺激に阻害的に働くことが報告されているため（Orly *et al.*, 1980）無血清培地で実験を行った。その結果、図 21 に見られるように LT/H-ras を導入した細胞株（LT/H-rasB1）では FSH により細胞内の cAMP 濃度の上昇が見られた。また、FSH 添加後 LH を加えた場合にはさらに cAMP 濃度が上昇していることがわかった。この細胞株では H-ras 遺伝子を Dexamethazone (Dex) により発現誘導可能なプロモーターにつないでいるため（「材料と方法」参照）、Dex を加えた状態と加えない状態での検討も併せて行った。その結果、ゴナドトロピンを添加した場合の cAMP の細胞内濃度は、Dex を添加した場合は添加しない場合に比べて約 2 倍ほど上昇していることがわかった（図 21 a）。また Forskolin を使用した場合にも同様な傾向が見られた（図 21 b）。

一方、v-src を導入した細胞株では、FSH により cAMP 濃度の上昇は見られるが LH により誘導される cAMP の量が LT/H-ras を導入した細胞株に比べて低いもの（図 21 a, SrcB）と、FSH により cAMP 濃度の上昇が全く見られず、しかも LH により cAMP の発現がほとんど見られないもの（図 21 a, SrcA）が存在した。このいずれの場合も Forskolin を培地に添加することにより cAMP の濃度が上昇している（図 21 b）ことから、細胞内には活性なアデニレートシクラーゼが存在していると考えられる。

<卵母細胞の減数分裂維持あるいは再開におよぼす活性>

顆粒膜細胞は卵胞内で卵母細胞の卵成熟を直接制御しているといわれており、顆粒膜細胞（Sato *et al.*, 1982; Sato and Koide, 1984; Sato *et al.*, 1986; Sirard and Bilodeau, 1990）あるいは卵胞液（Hsueh *et al.*, 1984; Sato *et al.*, 1982; Stone *et al.*, 1978; Tsafirri and Channing, 1975; Tsafirri and Bar-Ami, 1982; Tsafirri, 1985）からそれらの活性因子を単離したとの報告がある。また、顆粒膜細胞は卵母細胞と共に *in vitro* で培養を行うことにより、その卵成熟を抑制する活性を持つことが報告されている（Sato *et al.*, 1986; Sirard and Bilodeau, 1990）ため、初代顆粒膜細胞と樹立した細胞株についてこの卵成熟抑制活性について検討を行った（図 22）。

細胞を含まない場合には 51.2% の GVBD (Germinal Vesicle Break Down: 卵核胞崩壊) が観察されたが、初代顆粒膜細胞が存在する状態では 36.4% にまで抑制された。一方、顆粒膜細胞株では細胞株により抑制効果に差が認められた。SrcA での GVBD 率は 51.7% と、細胞を含まない場合と同程度であったが、SrcB、LT/H-rasB1 および

LT/H-rasD ではそれぞれ23.7%、29.3%、26.4% にまで GVBD を抑制していることが観察された。コントロールとして、同条件で繊維芽細胞株 (Balb3T3) を用い、GVBD に対する影響を調べたところ抑制効果は見られなかった。

<ホルモンまたは薬剤による遺伝子発現の変化について>

図21と図22の結果から、本研究により樹立された顆粒膜細胞株は初代顆粒膜細胞としての機能を保持していることが示唆されたので、次にゴナドトロピンもしくは Forskolin により細胞内の遺伝子発現に変化がみられるかどうかを調べた。

まず、使用した培養条件において遺伝子発現の検出が可能かどうかを初代顆粒膜細胞を用いて検討した。顆粒膜細胞はインヒビンの産生細胞として知られており、その活性を通して卵胞の発育調節を行っている。また、初代顆粒膜細胞においてゴナドトロピンまたは Forskolin で刺激することによりインヒビン α と β A サブユニットの mRNA 量の増加が報告されている (LaPolt *et al.*, 1990)。そこでブタインヒビン α サブユニットをプローブとして使用し、発現量が変化するかどうかをスロット・ブロットにより確かめた (図23a)。その結果、FSH を添加した場合には何も加えないときに比べ約20倍の発現量の上昇が確認された。また Forskolin を添加した場合にはコントロールの約29倍の発現量がみられた。これらのことから、この細胞培養条件において遺伝子発現の変化が起り得ることがわかったので、同じ条件を用いて顆粒膜細胞株における遺伝子発現の変化を調べた。

初代顆粒膜細胞に対して FSH 処理を行った場合に β -アクチン mRNA 量の減少が報告されているため (Ben-Ze'ev and Amsterdam, 1989)、ここでは細胞株の遺伝子発現の変化をみる指標として β -アクチンを用いた (図23b)。初代顆粒膜細胞ではゴナドトロピンおよび Forskolin の添加により β -アクチン mRNA の発現量の減少がみられた。一方、細胞株ではホルモンまたは薬剤の影響がみられるものとみられないものが存在した。src を導入した細胞株では刺激に対する β -アクチン mRNA 量の減少はみられなかったが、LT/H-rasB1 細胞株では Dex を添加した場合に限り初代培養細胞同様に β -アクチン mRNA 量の減少がみられた。

考察

卵胞の発育過程において時期特異的発現を示す遺伝子を単離、解析する目的で行った実験により単離したクローンのうち、特異的な発現が特に明確な5つの cDNA クローンをとりあげた (表1)。mRNA の発現レベルから判断して黄体特異的な発現のみられるものはブタのコラゲナーゼインヒビター (TS543)、ミトコンドリア H^+ -ATPase (TS537)、ミトコンドリアチトクローム c 酸化酵素 (TS049)、および PSP にホモロジーのある TS507 の4種類であった。またブタのインヒビン α -サブユニット (TS052) は顆粒膜細胞特異的であることが Northern hybridization により明らかになった (図4)。

<TS543について>

本研究で単離したこれら5種の cDNA クローンのうち、TS543 は顆粒膜細胞の黄体化に際して特異的な発現がみられ (図4a)、データベースでの検索の結果ブタのコラゲナーゼインヒビター遺伝子に相当することがわかった (Tanaka *et al.*, 1992)。

コラゲナーゼインヒビターはコラゲナーゼ以外にもゼラチナーゼ、プロテオグリカンナーゼなど細胞外マトリックス成分を分解する様々なメタロエンドプロテアーゼの活性調節を通して結合組織の構築に広く関係している酵素である (Stricklin and Welgus, 1983; Heath *et al.*, 1982; Welgus *et al.*, 1979; Sella *et al.*, 1979)。そういった機能上、その存在は様々な組織に認められる (Welgus and Stricklin, 1983; Cooper *et al.*, 1959; Welgus *et al.*, 1985; Harris Jr. *et al.*, 1984; Sellers and Murphy, 1981; Woolly, 1984; Cawston *et al.*, 1981; Carmichael *et al.*, 1986; Seltzer *et al.*, 1981)。卵巣では、現在までに排卵前の卵胞液中でその活性が認められており (Curry Jr. *et al.*, 1988; Seppala *et al.*, 1985; Gaddy-Kurten *et al.*, 1989)、さらにその活性は、LH とプロゲステロン等のステロイドホルモンによって上昇することが報告されている (Curry Jr. *et al.*, 1988; Curry Jr. *et al.*, 1990; Salckmann *et al.*, 1986)。またその機能としては卵胞のまわりを取り囲んでいる結合組織においてコラゲナーゼの活性を制御して排卵のための破裂口をつくる際の調節を行うことなどが考えられている (Curry Jr. *et al.*, 1988; Harris Jr. *et al.*, 1984; Curry Jr., *et al.*, 1986; Espey, 1967; Curry Jr. *et al.*, 1989; Clark *et al.*, 1985; Otska *et al.*, 1984; Reich *et al.*, 1985)。

一方、本研究で行った、Northern hybridization および免疫組織化学的染色での実験結果より、コラゲナーゼインヒビターの転写産物、翻訳産物は、共に黄体期特異的に存在していることが示唆された (図4a、図13)。コラゲナーゼインヒビターの転写物の発現が特に強く確認されている初期と開花期は、排卵後、黄体細胞が質量とも増加する時期に当たっており、黄体組織構築のためにコラーゲンが多量に必要であると考えられる。この時期にみられるコラゲナーゼインヒビターの強い発現はこのことを支

持するものである。また、開花期の黄体では特に血管周辺や黄体周囲の基底膜部分といった結合性組織にその翻訳産物の発現が確認され（図13）、黄体の再構築、およびそれに伴う血管系の再構築にコラゲナーゼインヒビターが作用している可能性が考えられる。さらにコラゲナーゼインヒビターを含むTIMP-1は細胞増殖促進活性を持つことも報告されており (Bertaux *et al.*, 1991; Kawabe *et al.*, 1991; Nagase, 1992)、この活性の黄体構築との関係も考えられる。

翻訳産物の局在性に関しては、図13にみられるように黄体周囲の基底膜や血管周辺など結合組織性の部分に多く認められたが、Northern hybridization から得られた知見では、コラゲナーゼインヒビター mRNA は、黄体を構成している黄体細胞で転写されていると考えられる。また Nomura ら (Nomura *et al.*, 1989) によるマウス卵巣の黄体を用いた *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、本研究と同様に TIMP (Tissue Inhibitor of Metalloprotease) の mRNA を黄体特異的に検出している。ここにみられる転写産物と翻訳産物の局在部位の違いから、コラゲナーゼインヒビターの mRNA は黄体細胞内で合成され、翻訳されたタンパク質は結合組織に蓄積されている可能性が考えられる。

コラゲナーゼインヒビターはコラゲナーゼと 1:1 のコンプレックスを作ってその制御を行っている (Welgus *et al.*, 1979; Cawston *et al.*, 1983; Welgus *et al.*, 1985) ことから、本研究における抗コラゲナーゼインヒビター抗体を使った結果は、コラゲナーゼの存在を反映している可能性が考えられる。実際、安藤 (Andoh, 1992) は免疫組織化学的染色を行い、開花期の黄体ではコラゲナーゼの存在をコラゲナーゼインヒビターと同様に黄体周囲の結合組織に認めている。その一方、初期の黄体と白体では、コラゲナーゼインヒビターはほとんど確認されないが、コラゲナーゼは黄体全域に分散した形で存在していると報告している。この結果より、コラゲナーゼは常に黄体に存在し、黄体組織や血管系の再構築（初期）または黄体の退行（白体期）に作用しているが、黄体が完成し機能している時期（開花期）にはインヒビターと 1:1 のコンプレックスを形成することによりその活性が抑制され、完成した黄体の構造を保護している可能性が考えられる。

本研究において、TS543 cDNA クローンの全長（約 700 塩基対）を使用して行った Northern hybridization では、黄体期でブロードなあるいは複数のバンドがみられた（図7）。このことから、大きさがやや異なる複数種の転写物の存在が考えられる。この複数種の転写物については、i) poly-A 付加など転写物への修飾の違い、ii) 時期特異的なスプライシングによるもの、iii) あるいは異なった転写制御を受けている複数の相似な遺伝子の存在、の3通りの可能性が考えられる。しかし、図7でみられるように、この TS543 cDNA クローンの 3' 末領域約 200 塩基対をプローブとして用いた場合、全長をプローブとした場合とシグナルパターンが異なっているため、転写物へ

の修飾が原因であるとは考えられない。従ってスプライシングあるいは相似な遺伝子の存在が原因であろう。つまり黄体発育過程の特定の時期には TIMP が複数種存在している可能性が考えられる。しかもここでみられる異なる大きさの転写物の発現は、初期の黄体と開花期の黄体で特に強く認められ、TS543 の時期特異的な発現をさらに補助する形となっている。もし複数種類の TIMP が互いに重複した時期に発現していることが事実なら、コラゲナーゼインヒビターを含む TIMP の黄体の構築における重要性を裏付けているものと考えられる。この原因がスプライシングによるものか別の遺伝子の存在によるものかを明らかにするためにはゲノムの解析が必要であると思われる。

<TS507について>

TS507 は Northern hybridization の結果（図4b）から黄体期特異的な発現の確認されたクローンである。TS507 cDNA クローンはその塩基配列とそこから予想されるアミノ酸配列より、前立腺の分泌タンパク質である PSP と ORF 全域においてホモロジーの存在することが明らかとなった（図9）。TS507 cDNA から予想されるアミノ酸にはグリコシル化を受ける部分があり（図8a）、また Hydrophobicity 解析より N 末端部分に疎水性部分が存在しているため（図8b）、構造上分泌タンパク質である可能性が示唆された。この点に関しても Mbikay ら (Mbikay *et al.*, 1987) の報告している PSP での知見と一致している。また Digoxigenin 標識した cDNA をプローブとして *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果から、この転写産物は血管周囲に存在する黄体実質細胞で特に強く発現していることがわかった（図14）。これらの実験結果から TS507 は黄体実質細胞で合成された後、細胞外に分泌され機能することが予想される。また、その血管周囲での強い発現パターンから血中の何らかのホルモンによりその発現が誘導されていることも予想できる。

PSP は本来、ヒトの精漿タンパク質として発見され、前立腺でのみ発現していることが報告されているタンパク質である (Kohan *et al.*, 1986; Mbikay *et al.*, 1987)。またある種のサルにおいても前立腺特異的にその発現が確認されている (Mbikay *et al.*, 1988)。さらにヒトの前立腺から分泌されるほかの多くのタンパク質がそうであるように (Lad *et al.*, 1984) TS507 もグリコシル化を受ける部分が予想された（図8a）。これらのことから PSP にホモロジーのある TS507 が前立腺でも発現している可能性が考えられたので、TS507 の雄性組織での発現を調べたが、ブタの前立腺では TS507 の発現は検出されなかった（図16）。また、ヒト PSP cDNA をプローブとした、ヒトの卵巣に対する Northern hybridization にもシグナルは検出されておらず (Ulvback *et al.*, 1989)、さらに、PSP の発現が確認されているヒト前立腺に対し TS507 をプローブとして Northern hybridization を行った結果においてもヒトの前立腺に TS507 の発現は認

められなかった(図15)。これらのことから、TS507は、前立腺タンパク質であるヒトPSPにホモロジーを持ちながら、その発現部位を異にする別のタンパク質であることが示唆された。

またPSPと同様(Mbikay *et al.*, 1987)、精巣にはTS507の発現は認められなかった(図15)。ヒト卵巣にもその発現はみられないが、実際にヒト卵巣ではTS507が発現していないのか、使用したRNAの問題であるのか現在のところ明らかではない。ここで使用したRNAは卵巣全体より得たものであり、またその卵巣に適当な時期の黄体が含まれていたかどうかは不明である。仮にTS507が発現している時期の黄体が含まれていたとしても、その数はヒトの排卵数から考えて1または2個程度であるので、卵巣全体のRNAに対して行った実験では検出できない可能性が高い。一方で人の胎盤に抗PSP抗体に反応する物質が存在するという報告もされている(Hurkadli *et al.*, 1986)ので、雌性組織にPSPタンパク質が存在している可能性もなお否定できない。

現在までに報告されている生殖に関与する組織での分泌タンパク質は、進化上同等物であると予想されるものであっても種間で構造的に保存されていないものも多い。実際、ヒトの抗PSP抗体、またはPSP cDNAを用い、マウスとラットの前立腺に対して行った結果からはこれらの動物にPSPのシグナルは確認されていない(Mbikay *et al.*, 1988)。このことからヒトと齧歯類のPSPは一次構造が大きく異なってしまっている可能性が考えられる。一方、本研究によりブタから得られたTS507はヒトPSPとDNAレベルで67%、そこから予想されるアミノ酸レベルで54%のホモロジーが存在しているため、比較的近縁種であると予想される。それにも関わらず、前述の結果よりTS507はPSPのカウンターパートではなく、卵巣の黄体といった別の組織でのみで発現している様式は興味深い。Noletら(Nolet *et al.*, 1991)はヒトとサルのPSP遺伝子を単離しそのプロモーターを調べているが、そこにはステロイドホルモンに応答する配列が認められている。TS507はそのホモロジーからPSPとファミリーを形成している別の遺伝子であるか、または組織特異的な選択的スプライシングを行う遺伝子である可能性が考えられるが、仮にTS507がPSPとファミリーを形成している遺伝子であるならば、TS507のプロモーターにもステロイドホルモンに応答する配列が存在していることが予想され、この2つの遺伝子の性特異的な発現は性ホルモンにより制御されている可能性が考えられる。

<TS049とTS537について>

TS049とTS537は共に黄体期での発現が確認されたcDNAクローンであるが(図4c、d)、データベースでの検索の結果、共にミトコンドリアゲノムにコードされた電子伝達系に関与するタンパク質、ウシミトコンドリア cytochrome oxidase subunit II

(COII: Young and Anderson, 1980; Anderson *et al.*, 1982)、ウシミトコンドリア ATPase Protein 6 (ATPase6: Anderson *et al.*, 1982) のブタのカウンターパートであることが予想される(図10、11)。

TS537とウシのATPase6のN末端におけるアミノ酸ホモロジーは65%であり、さほど保存されていないが、すでに報告されているヒトとウシ由来のATPase6の同じ部分における比較においてもホモロジーは64%と比較的低いレベルにある。またヒトとウシのATPase6全長にわたるアミノ酸ホモロジーも80%に至らない程度であり、すべての生物で共通に存在している電子伝達系のタンパク質もさほど保存されていないことがわかる。

ミトコンドリアDNAでは、両方の鎖からのDNA鎖の全長をコピーした長大な転写物が作られた後、ヌクレアーゼによるプロセッシングを受けて各RNAに分かれることが知られている。COII遺伝子とATPase6遺伝子は共にミトコンドリアゲノムのL鎖側からの転写物にコードされており、プロセッシングを受けた後の最終的なmRNAの全長はそれぞれ683塩基、681塩基である(Anderson *et al.*, 1982)。図4c、dにおいてTS049では3カ所、TS537では2カ所にシグナルが確認できるが、このうちCOII、ATPase6のmRNAに相当するのは最小のシグナルであることが予想される。一方、ウシのCOII遺伝子とATPase6遺伝子はミトコンドリアゲノム上では隣接して存在しており、COIIの開始コドンからATPase6の終止コドンまでは1569塩基対である。従って図4c、dに共通してみられる1.8k塩基のシグナルはブタのCOIIとATPase6を含むプロセッシングの共通の前駆体である可能性も考えられる。

さらに、TS049の900塩基の位置の転写物は、開花期にその量が最大になっているが、それ以降になると約700塩基の転写物の量が増加していることが確認できる。このことよりゲノム全長にわたるRNAから1.8k塩基にまでプロセッシングを受けた前駆体RNAは時期特異的に900塩基、そして最終的に700塩基のCOII mRNAにまで順を追ってプロセッシングされている可能性が考えられる。真核細胞内に存在するゲノムを持つオルガネラでは原核様式の転写が行われていることが知られているが、本研究の結果より、このオルガネラでの遺伝子発現には細胞がおかれている環境に応じ、プロセッシングなどの制御が行われていることが予想される。さらにこれらのプロセッシングを誘導している細胞性の因子がミトコンドリアに存在していることも考えられる。

黄体はステロイドホルモンを分泌するために特殊化した組織である。ステロイドを盛んに分泌している黄体細胞のミトコンドリアは、電子顕微鏡での観察から発達したクリステを持っていることがわかっている(Nakano, 1990)。この形態的な観点からミトコンドリア内膜に存在する電子伝達系酵素群の発現量が上昇していることが予想される。また、化学的な観点から考えた場合、黄体でのステロイドホルモン合成にはミトコンドリアや小胞体に存在する4種のチトクロームP450が重要な働きを担ってい

ることが知られている (Miller, 1988)。チロクローム P450 は NADPH からの電子を利用して基質を酸化し反応を進めるため、NADP⁺ から NADPH をとぎれることなく産生する状態が黄体には必要である。NADPH の供給は主にペントースリン酸経路によって行われるが、NADH からの交換反応によっても可能なことがわかっている。この点に関してミトコンドリアはクエン酸回路による NADH の産生を通して NADPH の供給を助けていることが考えられる。黄体における特殊化したミトコンドリアがこの NADH の合成を盛んに行っているとしたら、NADH を電子の供給源とする電子伝達系も活性化している可能性がある。本研究により単離された2種のミトコンドリア電子伝達系の酵素は黄体期での発現が確認でき、この予想に矛盾しない。特に TS049 は黄体機能が最も活発な開花期の黄体で発現量が多く認められ、ステロイド等の代謝系の活性化を反映していることが考えられる。また初期の黄体では黄体細胞は増殖状態にあり、TS049、TS537 のこの時期での発現は増殖のためのエネルギー産生に関与しているとして理解できる。しかし黄体が退行状態にある白体期での TS537 の最も強い発現は現在のところ不明である。

<TS052について>

顆粒膜細胞は、インヒビンの産生場所である。このことは、Northern hybridization による転写産物の確認 (Davis *et al.*, 1986) や抗体を使った翻訳産物の確認 (Cuevas *et al.*, 1987; Woodruff *et al.*, 1987)、および活性の測定 (Anderson and DePaolo, 1981; de Jong and Sharpe, 1976; Erickson and Hsueh, 1971) を行うことによって明らかにされている。しかもその存在は種々の動物細胞について確かめられている (Anderson and DePaolo, 1981; de Jong and Sharpe, 1976; Ying, 1988)。ブタ生体内の顆粒膜細胞を用いた本研究においてもインヒビン (TS052) mRNA の顆粒膜細胞特異的な発現が認められ (図 4 e)、この知見に一致していた。この事実、今回行われた Northern hybridization のコントロールとしても意味をなすと考えられる。

インヒビンの作用機構は現在までにかなり明らかになっており (図 2 4)、次のようである。性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gn-RH) は視床下部より分泌されて、脳下垂体前葉に卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を促す。その結果分泌された FSH は卵胞の発育を促進する。卵胞の発育に伴いインヒビンを産生している顆粒膜細胞はその数を増し、同時に各細胞の合成するインヒビン量も増加する (Turner *et al.*, 1989; LaPolt *et al.*, 1990)。その結果インヒビンの分泌量は増加する。インヒビンはその生理機能として脳下垂体前葉での FSH- β サブユニットの合成を抑制するので、その結果 FSH の分泌を抑える (Attardi *et al.*, 1989; Rivier *et al.*, 1986; Rivier and Vale, 1989; Farnworth *et al.*, 1988)。顆粒膜細胞からのインヒビン分泌量の増加に伴い FSH の分泌量は減少し、卵胞の発育も抑制される。つまり顆粒膜細胞は卵胞内で卵母細胞と共に発育すること

によりその成長をモニターしている。そして下垂体からの FSH 分泌にフィードバック効果を発揮し、その成長を制御している。これは顆粒膜細胞による卵胞制御の一つのよい例である。

図 3 に示した Modified plaque hybridization からわかるように、顆粒膜細胞でのシグナルは判別にかなりの困難が伴う。この状態は Differential hybridization や Northern hybridization に関しても同様であり、このことが顆粒膜細胞特異的な cDNA クローン単離を難しいものになっている。顆粒膜細胞から RNA を調製する場合、如何に RNA の分解を避けるかが問題になる。この点について様々な試みを繰り返した結果、一度液体窒素中で凍結した卵巣を再度解凍する方法 (材料と方法参照) が最も分解の程度が少ないようであった。しかしこの方法では一度解凍の過程を経るため、無傷の RNA を得ることは困難であった。そのため、これをもとに作った cDNA は短いものになってしまったと考えられる。図 3 に示した Modified plaque hybridization において、シグナルが不明瞭なのは多分にこのことが影響していると思われる。

<初代顆粒膜細胞および顆粒膜細胞株について>

生体内の顆粒膜細胞は脳下垂体からのゴナドトロピンを第一のシグナルとしてステロイド合成や卵母細胞の制御などの卵胞機能を行っている。この調節には各種の成長ホルモンなどのタンパク性の因子やステロイドホルモンが関与していることがわかっている (Tanaka *et al.*, 1993)。これらのホルモンや様々な因子は多くの場合顆粒膜細胞内の遺伝子発現の変化を通してその機能を発揮していることが考えられる。本研究において生体内での顆粒膜細胞の遺伝子発現の変化を確認したが、顆粒膜細胞の遺伝子発現制御あるいはその産物の機能を解析するために顆粒膜細胞の *in vitro* 培養系を検討した。その目的の一つとして、外来遺伝子導入による顆粒膜細胞株の樹立とその性質の検討を行った。

ラットの初代顆粒膜細胞では血清を添加した条件で培養することにより分裂増殖し、体積も 60 倍になると報告されている (Orly *et al.*, 1980)。このことはブタ初代顆粒膜細胞でも確認できる。初代顆粒膜細胞は培養開始後 2-3 日で形態変化が明らかになり、一週間余りで繊維状のかなり大きな細胞に変化する (図 1 7)。やがて容器の底に均一な層を形成し、それ以上の成長増殖は起こらない。

一方、顆粒膜細胞株では様相が異なる。src を導入したものは、容器の底一面に増殖した後も、完全に變形してしまう以前の初代顆粒膜細胞の状態をとり、また逆に LT/H-ras を導入した細胞株では、培養開始時から變形後の繊維状の形態をとっている (図 1 8)。このように細胞の形態面に着目すると src を導入した細胞株の方が LT/H-ras を導入した細胞株よりも初代顆粒膜細胞に近いといえる。しかしこれらの細胞株は、容器の底一面に増殖した後も増え続け、所々に顆粒状の細胞塊を作る点で異

なっている。またこれらの細胞株では2年間にわたって、少なくとも9回の継代培養と2回の凍結融解を行ってきた。Amsterdam ら (Amsterdam et al., 1988) の報告している顆粒膜細胞株に照らし合わせるとこの間に少なくとも30世代は経過しているが、その間に形態的な変化はみられないためこれらは安定な細胞株であると考えられる。

<導入した外来遺伝子の発現について>

導入した外来遺伝子の発現状態を免疫沈降反応 (図19) とsrc キナーゼの自己リン酸化活性 (図20) により確認した。

抗 v-src 抗体を用いて免疫沈降を行った結果では src を導入した細胞株に強いシグナルが確認された (図19)。この結果では、LT/H-ras を導入した細胞株とコントロールであるラット繊維芽細胞株 (3Y1) にも 60KDa のシグナルが存在しているが、これは細胞に内在している src 遺伝子 (c-src) によるものであると考えられる。一方、src の自己リン酸化反応をみた結果 (図20) では、シグナルは src を導入した細胞株でのみ確認された。これらのことから、この細胞株では c-src は発現しているが、それは活性がないか、または非常に弱く、細胞の株化には関与していないことがわかる。

抗 ras 抗体を用いて免疫沈降を行った結果 (図19)、LT/H-ras を導入した細胞株でのみ ras タンパク質の発現が確認されたが、そのシグナルの強さから発現量は多くはないであろうと思われる。しかし LT/H-ras を導入した顆粒膜細胞株の形態は Amsterdam ら (Amsterdam et al., 1988) の Gs cell line (顆粒膜細胞に SV40 の全ゲノムのみを導入したもの) とは全く異なっているが、Grs cell line (顆粒膜細胞に SV40 の全ゲノムと Ha-ras 遺伝子を導入したもの) とは非常によく似ている。従って外来導入した H-ras 遺伝子の発現量は多くはないが、充分機能する発現量にあると考えられる。また LT/H-ras line と Grs line の形態的な類似から、SV40 ゲノムにコードされた遺伝子のうち、顆粒膜細胞を株化するために重要なものは Large T 抗体であることも示唆された。

本研究で用いた H-ras 遺伝子はグルコルチコイドで発現を誘導できるプロモーターの下流に位置しているが、図19の実験において、誘導を行わない状態で ras の発現が確認された。この原因に関しては2つの可能性が考えられる。1つは、この実験を行った条件では細胞培地に血清が含まれていたため、血清中のグルコルチコイドにより導入した ras が発現した可能性である。2つ目は、顆粒膜細胞そのものの性質である可能性である。前者に関しては、一般に血清1リットル中に $0.5 \mu\text{g}$ のコルチゾンが含まれていると報告されている (Maurer, 1992) ので、培地に血清を10%で添加した場合には1リットル中に50ngのコルチゾンが含まれることになる。しかしこの量は発現誘導に用いるグルコルチコイドの量 (Dexamethsone の場合で $1 \mu\text{M}$ =

$392 \mu\text{g/l}$ で使用) に比較してかなり微量であるといえる。一方、後者の可能性に関して、図21の実験ではこの細胞株を血清存在下で24時間培養した後、血清を除いて合計49時間培養しているが、培養時間を終了した時点でも細胞の形態に大きな変化は現れていなかった。従って、上述した2つの可能性のうち後者が ras 遺伝子の発現に関与している可能性が強いと考えられる。

<ゴナドトロピンまたは薬剤によるcAMPの誘導について>

顆粒膜細胞表面に発現している FSH レセプターおよび LH レセプターはそのアミノ酸配列から7回膜貫通型の構造をとると予想され (Sprengel et al., 1990; McFarland et al., 1989; Loosfelt et al., 1989)、シグナルはGタンパク質を経由してアデニレートシクラーゼに伝達されることが考えられている。また実際ゴナドトロピンにより顆粒膜細胞内の cAMP 濃度が上昇することも知られており、ゴナドトロピンの作用は cAMP 量の変化を通して遺伝子発現につながっている可能性が考えられる (March, 1976; Zor, 1983; Amsterdam et al., 1975; Amsterdam et al., 1989)。そこで、樹立した顆粒膜細胞株でのゴナドトロピンまたは薬剤感受性を cAMP 濃度の変化により調べた。

この実験を行うに際して、ホルモンは血清存在下では作用しにくいことが報告されているため (Orly et al., 1980; Erickson et al., 1979)、無血清状態で細胞を培養することが求められる。ところが、ラットの顆粒膜細胞では無血清培地を使用した細胞培養に成功した例がこれまで数多く報告されているが (Erickson and Hsueh, 1978; Dorrington et al., 1975; Orly et al., 1980)、ブタ顆粒膜細胞では困難である (田中、板鼻; 未発表)。そこで血清を一定時間添加することにより細胞を安定化させ、発現誘導を行う際に血清を完全に洗浄し無血清状態にする方法を試みた。この条件下において、コントロールとして初代顆粒膜細胞に FSH を添加した場合、cAMP 濃度が約4倍に上昇していることが確認されたため (図21a)、この条件は確かに FSH による発現誘導が可能な条件であると考えられた。

また、顆粒膜細胞は FSH の作用により LH レセプターを発現することが広く知られている (Amsterdam et al., 1981; Erickson et al., 1979; Rani et al., 1981; Zelenik et al., 1974; Richards and Midgley, 1976; Richards et al., 1976)。LH レセプターもリガンドの結合により cAMP 濃度を上昇させるため、この FSH による LH レセプターの発現誘導を、LH 添加による cAMP 濃度の上昇により検証した。その結果、初代顆粒膜細胞において LH 添加により cAMP 濃度の上昇がみられたため (図21a)、この培養条件の下では FSH の作用により LH レセプターが誘導されていると思われる。

顆粒膜細胞株で同様の実験を行ったところ、src を導入した細胞株では FSH に感受性のあるもの (図21a: SrcA) と、ないもの (図21a: SrcB) が存在した。SrcA 細胞株では FSH に対しては cAMP の上昇はみられないが、Forskolin を添加した場合に

は約2倍に上昇していた(図2 1b)。このことから、SrcA細胞株ではアデニレートシクラーゼの活性は残っているが、FSHレセプターか、もしくはその下流のエフェクター因子が機能を失っている可能性が考えられる。またこのSrcA細胞株ではLHを添加した場合にはcAMPの上昇は全くみられない。この原因については2通りの可能性が考えられる。1つは、LHレセプターの発現はcAMP濃度の上昇により誘導されるが(Goxe *et al.*, 1992)、SrcAではFSHによるcAMPの上昇がないため、LHレセプター自身が発現していない可能性である。もう一つはLHレセプターとアデニレートシクラーゼの間に存在するエフェクター因子の欠損による可能性である。この解決にはLHレセプターの結合実験などによりレセプターの存在を確かめる必要がある。

一方、SrcB細胞株ではFSH添加によりcAMPの上昇がみられるが、LHの添加ではコントロールと同程度のcAMP濃度しか観察されなかった(図2 1a)。このことからこの細胞株にはFSHは作用するが、LHレセプターは発現していないと思われる。この2つのsrc導入細胞株の性質の違いが何に起因しているのか明らかではないが、宿主になった顆粒膜細胞の性質と、導入したsrc遺伝子が顆粒膜細胞ゲノムに挿入された位置の違いが関与していると考えられる。細胞株を作る際に用いた細胞は複数の卵胞に由来しているが、顆粒膜細胞の性質はそれが含まれる卵胞の成熟状態に依存する(Zlotkin *et al.*, 1986; Goldring *et al.*, 1986; Goldschmit *et al.*, 1989)ので、src遺伝子導入顆粒膜細胞株の性質の違いはこれに関係している可能性がある。また、図1 9と図2 0にみられるように、導入したv-src遺伝子の発現量、活性共にSrcB細胞株の方が強いので、このことも細胞株の性質に関与しているのかもしれない。

LT/H-rasを導入した細胞株については、導入したH-ras遺伝子上流のプロモーターを誘導する条件(+Dex)または誘導しない条件(-Dex)を用いてcAMP量の変化を調べた(図2 1)。この細胞株ではDexamethasoneを加えた状態でも加えない状態でも、FSH、LHによるcAMP量の上昇がみられた(図2 1a)。これはこの細胞株がゴナドトロピンに感受性であることを示している。また+Dexと-Dexを比較した場合、+Dexの方がゴナドトロピンまたはForskolinへの反応性が高い(図2 1a、b)。この違いはDexamethasone添加によるH-ras遺伝子の発現量の上昇と一致していると思われる。一方、+Dex、-Dexともに細胞の形態はAmsterdamら(Amsterdam *et al.*, 1988)のGs細胞株よりもGrs細胞株に似ており(前項参照)、さらに血清を加えた条件で培養した場合(図1 8)でも大きな形態的な変化はなかった。そのため+Dexだけでなく、-Dexの条件でも導入したH-ras遺伝子は発現していると思われる。もしそうであれば+Dexの条件でのホルモンや薬剤に対する感受性の高さは、発現しているrasにdose-dependentに反応している可能性がある。このことはDexを加えた場合と加えない場合で、発現しているH-rasの量を比較することによりさらに明確になるとと思われる。

図2 1bからわかるようにForskolinを添加した場合の顆粒膜細胞株のcAMP濃度の上昇は初代顆粒膜細胞に比較して1/2から1/8程度である。このことから細胞株では活性のあるアデニレートシクラーゼが減少していることが想像される。それにも関わらず、いくつかの細胞株ではコントロールのcAMP濃度が初代顆粒膜細胞より高い。従って細胞株では活性なアデニレートシクラーゼは少ないが、初代顆粒膜細胞より高い割合のアデニレートシクラーゼが定常的にONになっている可能性が考えられる。

<顆粒膜細胞株の卵成熟抑制活性について>

先に述べた様に、顆粒膜細胞が卵胞内で示す重要な機能の一つとして、卵母細胞の成熟を減数第一分裂前期で抑制していることがあげられる。この卵成熟抑制活性は単離された顆粒膜細胞でも確認されており、Maturation Arresting Factor (MAF) などとよばれている(Sato *et al.*, 1982; Sato *et al.*, 1984; Sato *et al.*, 1986; Sirard and Bilodeau, 1990; Racowsky *et al.*, 1989)。またこの活性には卵母細胞内のcAMPが関与するとの報告もある(Denkel *et al.*, 1984; Sirard and First, 1988; Wasserman *et al.*, 1976)。

前項より、ゴナドトロピンによる顆粒膜細胞の機能発現に最も深く関与しているcAMPの濃度が細胞株でも変化しており、初代顆粒膜細胞としての性質を細胞株が保持している可能性が得られた。そこで、樹立した細胞株においてもこの減数分裂抑制活性が保たれているかをBio-assayにより検討した。

卵胞より単離した卵母細胞を細胞の存在しない状態(empty)で培養することにより51.2%の卵核胞崩壊が生じた(図2 2b)。またネガティブコントロールとしてラット繊維芽細胞株(3Y1)を用いた場合には、卵核胞崩壊の抑制効果は認められなかった。また、この結果は顆粒膜細胞株を単離する際に使用した選択マーカーであるネオマイシン耐性遺伝子が存在しても変化はなかった。これに対し初代顆粒膜細胞をフィーダーレイヤーとして共存させた場合、卵核胞崩壊は36.4%まで抑制された。一方、顆粒膜細胞株を用いた場合には、SrcA(GVBD=51.7%)を除き、強い抑制効果が認められた。顆粒膜細胞株での卵成熟抑制効果の傾向と、ゴナドトロピンによるcAMP量への影響(図2 1)とに関係がみられることは注目に値する。つまりゴナドトロピンに対する感受性の失われているSrcA細胞株では卵核胞崩壊の抑制効果はみられず、感受性を保っているSrcBおよびLT/H-rasB1では抑制効果が確認されている。このことはゴナドトロピン感受性の細胞株(SrcB、LT/H-rasB1)が初代顆粒膜細胞の性質を保持していることをさらに支持している。

図22bの"empty"にみられるGVBD率は、Satoら(Sato *et al.*, 1982)の結果(GVBD率=70%)に比べてやや低くなっている。これに関しては、使用した卵母細胞の発育程度が均一ではなかった可能性がその原因の1つとして考えられる。Motlikら(Motlik *et al.*, 1984)は、ブタ卵母細胞のin vitroでの卵成熟再開能の有無が卵母細胞

の大きさに関係していると報告しており、その直径が 0.8-1.6mm、1.7-2.2mm、3-5mm の卵母細胞の GVBD 率はそれぞれ 66%、94%、100% であったとしている。本研究においても使用したすべての卵母細胞を顕微鏡下で観察し、明らかに大きさの異なるものは排除したが除去しきれなかった可能性は否定できない。また培養を行う際や染色後の観察においても状態の悪い卵母細胞は除去した（卵丘細胞の付着程度、細胞質や核の状態などより判断した：「材料と方法」参照）が、これについても完全に除去しきれなかった可能性がある。これらの可能性が重なった結果として GVBD 率が低下したものと思われる。

このように抑制活性を保持している細胞株が得られたことは、顆粒膜細胞による卵母細胞の減数分裂抑制維持機構を解析していくうえで非常に有用な材料（系）となることが期待できる。

<細胞株での遺伝子の発現誘導について>

ゴナドトロピンによる cAMP 濃度の変化と卵成熟抑制活性から、初代顆粒膜細胞の性質を保持した顆粒膜細胞株が得られたと考えられる。そこでこれらの細胞株において、実際にホルモンもしくは薬剤刺激による遺伝子発現の変化が追跡できるかどうかを調べた（図 2 3）。

まず、使用した培養条件の遺伝子発現に対する可能性を、ゴナドトロピンまたは Forskolin により発現量の増加が知られているインヒビン α -サブユニットを用いて検討した（図 2 3 a）。初代顆粒膜細胞に FSH を添加した場合には何も加えないときに比べ約 20 倍の転写物の発現が確認された。また Forskolin を添加した場合にはコントロールの約 29 倍の発現量がみられた。一方、FSH に続いて LH を添加することにより、インヒビン α -サブユニットの発現量は減少した。このことは図 4 a における Northern hybridization での結果と一致しており、LH の添加により顆粒膜細胞の黄体化が起こりつつあることを示唆していると考えられる。以上のことからこの条件において遺伝子発現の変化が誘導されることが明らかになったので、同じ条件を用いて顆粒膜細胞株における遺伝子発現の変化を調べた（図 2 3 b）。

細胞株の遺伝子発現の変化をみる指標としては β -アクチンを使用した。 β -アクチンは初代顆粒膜細胞を FSH 処理することによりその mRNA 量が減少すると報告されており (Ben-Ze'ev and Amsterdam, 1989)、またその変化は顆粒膜細胞の黄体化に関与していると考えられる。初代顆粒膜細胞ではゴナドトロピンの添加により β -アクチン mRNA の発現量の減少がみられた。また Forskolin 刺激ではその発現量はコントロールの 1/2 にまで減少した。一方、src を導入した細胞株では刺激に対する β -アクチン mRNA 量の減少はみられなかったが、LT/H-rasB1 細胞株では Dex を添加した場合に β -アクチン mRNA 量の減少がみられた。

初代顆粒膜細胞および顆粒膜細胞株 (SrcA、LT/H-rasB1(+Dex)) での β -アクチン mRNA の変化量は、これらの細胞で認められた cAMP の変化量（図 2 1）といくらか相関が認められる。つまり cAMP 量が多い状態においては β -アクチン mRNA 量が少なく、その逆に cAMP 量が少ない場合においては mRNA 量が多く存在している。しかしそのような相関関係を認めた場合、なぜ cAMP 量の変化がみられた SrcB 細胞株では相関関係がみられないのか疑問が残る。また LT/H-rasB1 (+Dex) の LH と Forskolin ではその関係が逆転しており、さらに全体的にみても cAMP 量の変動の大きさが β -アクチン mRNA 量の変化の程度には反映されていない。このようなことから顆粒膜細胞における β -アクチン遺伝子の転写制御は cAMP だけに依存するものではない可能性も高い。また LT/H-rasB1 の -Dex と +Dex を比較した場合、+Dex でのみ β -アクチンの転写物の減少がみられるが、H-ras 遺伝子の発現量の変化がどのような仕組みでこの細胞株の性質に影響を与えているのかは現在のところ不明である。

<顆粒膜細胞株の性質に関するまとめ>

先述のように β -アクチン遺伝子の発現量の変化は、ゴナドトロピンによる顆粒膜細胞の発育、および黄体細胞への形態的な変化に関与している可能性が考えられる。従って図 2 3 b の実験により、初代顆粒膜細胞と同じ様に β -アクチン遺伝子の発現量の変化がみられた細胞株は、単にゴナドトロピンなどによる遺伝子発現の変化が可能というだけではなく、*in vitro* 系において黄体細胞への分化が可能な細胞株であることを裏付けているとも考えられる。この β -アクチン遺伝子での結果と先述の cAMP 量（図 2 1）、卵成熟抑制活性の結果（図 2 2）とを総合的に考えた場合、少なくとも LT/H-rasB1 (+Dex) 細胞株が顆粒膜細胞のモデルとして使用できる可能性が考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、五年間もの間にわたり熱心なご指導を賜りました竹家達夫先生、佐藤英明先生、並びに高浪満先生に心から深く感謝の意を表します。

また、岡穆宏先生、梶崎弘幸先生、青山卓史先生をはじめ、研究、学生生活を通じ、数多くの励ましや有益な助言を与えてくださった生体分子情報Ⅱ研究室の方々、並びに農学研究科家畜生体機構学研究室の方々に厚く御礼申し上げます。

そして、波頭経裕氏、鬼頭大介氏、加藤栄子さんをはじめとする名古屋大学OBのよき友人たちに深く感謝致します。

参考文献

- Adashi, E.Y., C.E. Resnick, A.J. D'Ercol, M.E. Svoboda, and J.J. Van Wyck. *Endcri. Rev.* 6(1985): 400.
- Adashi, E.Y., C.E. Resnick, M.E. Sobovoda, and J.J.V. Wyk. *Endocrinology* 115 (1984): 1227.
- Adashi, E.Y., C.E. Resnik, A.M.H. Brodie, M.E. Svoboda, and J.J.V. Wyk. *Endocrinology* 117 (1985): 2313.
- Albertini, D.F. and E. Anderson. *J. Cell. Biol.* 63 (1974): 243.
- Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J.D. Watson. "MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL". (1983).
- Amsterdam, A., S.R. Joseph, M.E. Lieberman, and H.R. Lindner. *J. Cell. Sci* 21 (1976): 93.
- Amsterdam, A., M. Knecht, and K.J. Catt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981): 3000.
- Amsterdam, A., Y. Koch, M.E. Lieberman, and H.R. Linder. *J. Cell. Biol.* 67 (1975): 894.
- Amsterdam, A., S. Rotmensch, and A. Be-Ze'ev. *Trends Biochem. Sci* 14 (1989): 377.
- Amsterdam, A., A. Zauberman, G. Meir, O. Pinhasi, B.S. Suh, and M. Oren. *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 85 (1988): 7582.
- Anderson, E. and D.F. Albertini. *J. Cell. Biol.* 71 (1976): 680.
- Anderson, L.D. and L.V. DePaolo. "Intragonadal Regulation of Reproduction". ed. P. Franchmont and C. P. Channing. London: Academic Press, (1981).
- Anderson, S., M.H.L. de Bruijn, A.R. Coulson, I.C. Eperon, F. Sanger, and I.G. Young. *J. Mol. Biol.* 156 (1982): 683.
- Andoh, N. プタ卵巣における遺伝子発現. Kyoto University, (1992).
- Attardi, B., H.S. Keeping, S.J. Winters, F. Kotsyuji, and P. Troen. *Mol. Cell. Endocrinol.* 3 (1989): 1236.
- Baird, A. and A.J.W. Hsueh. *Regulatory Peptides* 16 (1986): 243.
- Ben-Ze'ev, A. and A. Amsterdam. *J. Biol. Chem.* 262 (1987): 5366.
- Ben-Ze'ev, A. and A. Amsterdam. *Endocrinology* 124 (1989): 2584.
- Bertaux, B. and W.H.e. al. *J. Invest. Dermatol.* 97 (1991): 679.
- Bjersing, L. and S. Cajander. *Cell. Tissue Res.* 153 (1974): 1.
- Bortolussi, M., G. Marini, and A. Dal Largo. *Cell. Tissue Res.* 183 (1977): 32.
- Bothwell, Yancopoulos, and Alt. "Methds for cloning and analysis of eukaryotic genes". Jones and Bartlett Publishers, (1990).
- Bradford, M. *Anal. Biochem.* 72 (1976): 248.

Carmichael, D.F., A. Sommer, R.C. Thompson, D.C. Anderson, C.G. Smith, H.G. Welgus, and G.P. Stricklin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986): 2407.

Cawston, T.E., W.A. Galloway, E. Mercer, G. Murphy, and J.J. Reynolds. *Biochem. J.* 195 (1981): 159.

Cawston, T.E., G. Murphy, E. Mercer, W.A. Galloway, B.L. Hazleman, and J.J. Reynolds. *Biochem. J.* 211 (1983): 313.

Chang, M.C. *J. Exp. Zool.* 128 (1955): 378.

Channing, C.P. *Hormon Research* (1982):

Cicirelli, M.F. and L.D. Smith. *Dev. Biol.* 108 (1985): 254.

Clark, S.D., S.M. Wilhelm, G.P. Stricklin, and H.G. Welgus. *Arch. Biochem. Biophys.* 241 (1985): 36.

Cooper, T.W., A.Z. Eisen, G.P. Stricklin, and H.G. Welgus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1959): 2779.

Cuevas, P., S.-Y. Ring, N. Ling, F. Esch, and R. Guillemin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 141 (1987): 23.

Curry Jr., T.E., D.D. Dean, R.D. Koos, and W.J. LeMaire. *Biology of Reproduction (Suppl)* 34 (1986): 85.

Curry Jr., T.E., D.D. Dean, S.L. Sanders, N.G. Pedigo, and P.B.C. Jones. *Steroid* 54 (1989): 501.

Curry Jr., T.E., J.S. Mann, R.S. Estes, and P.B.C. Jones. *Endocrinology* 127 (1990): 63.

Curry Jr., T.E., S.L. Sanders, N.G. Pedigo, R.S. Estes, E.A. Wilson, and M.W. Vernon. *Endocrinology* 123 (1988): 1611.

Davis, S.R., F. Dench, I. Nikolaidis, J.A. Claments, R.G. Forage, Z. Krozowski, and H.G. Burgner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138 (1986): 1191.

Davoren, J.B., B.G. Kasson, C.H. Li, and A.J.W. Hsueh. *Endocrinology* 119 (1986): 2155.

de Long, F.H. and R.M. Sharpe. *Nature* 263 (1976): 71.

Demeter-Aolotto, M., W.E. Rainey, and E.R. Simpson. *Endocrinology* 132 (1993): 1353.

Denkel, N., E. Aberdam, and I. Sherizly. *Biol. Reprod.* 31 (1984): 344.

Denkel, N. and I. Sherizly. *Endocrinology* 116 (1985): 406.

Dorrington, J.H., Y.S. Moon, and D.T. Armstrong. *Endocrinology* 97 (1975): 1328.

Downs, S.M., S.A.J. Daniel, and J.J. Eppig. *J. Exp. Zool.* 245 (1988): 86.

Erickson, G.F. and A.J.W. Hsueh. *Endocrinology* 88 (1971): 653.

Erickson, G.F. and A.J.W. Hsueh. *Endocrinology* 102 (1978): 1275.

Erickson, G.F., C. Wang, and A.J.W. Hsueh. *Nature* 279 (1979): 336.

Espey, L.L. *Endocrinology* 81 (1967): 267.

Farnworth, P.G., D.M. Robertson, D.M. deKretser, and H.G. Burger. *Endocrinology* 122 (1988): 207.

Feng, P., M. Knecht, and K. Catt. *Endocrinology* 120 (1987): 1121.

Frazier, A.L., L.S. Robbins, P.L. Stork, R. Sprengel, D.L. Segaloff, and R.D. Cone. *Mol. Endocrinol.* 4 (1990): 1264.

Frederick, M.A. "Current Protocol in Molecular Biology". John Wiley & Sons Inc., (1987).

Freudenstein, J., S. Wagner, R.M. Luck, R. Einspanier, and K.H. Scheit. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171 (1990): 250.

Frohman, M.A. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. "RACE: Rapid Amplification of cDNA Ends", ed. Michael A. Innis, David H. Gelfand, John J. Sninsky, and Thomas J. White. San Diego: Academic Press, (1990).

Funkenstein, B., M.R. Waterman, and E.R. Simpson. *J. Biol. Chem.* 259 (1984): 8571.

Gaddy-Kurten, D., G.J. Hickey, G.H. Fey, J. Gaudie, and J.S. Richards. *Endocrinology* 125(1989): 2985.

Gilula, N.B. and M.L. Epstein. *J. Cell. Biol.* 78 (1978): 58.

Goldring, N.B., Y. Farkash, T. Goldschmit, and J. Orly. *Endocrinology* 119 (1986): 2821.

Goldschmit, D., P. Kraicer, and J. Orly. *Endocrinology* 124 (1989): 369.

Gore-Langton, R.E. and D.T. Armstrong. In "The Physiology of Reproduction". ed. E. Knobil and J. Neill. New York: Raven Press, 1988.

Goxe, B., R. Salesse, J.J. Remy, N. Genty, and J. Garnier. *J. Mol. Endo.* 8 (1992): 119.

Hammond, J.M., J.L.S. Baranao, D. Skakeris, A.B. Knight, J.A. Romanus, and M.M. Rechler. *Endocrinology* 117 (1985): 2553.

Hanukoglu, I. In "Follicular Development and Reproduction". In Ares-Serono Symposia in edited by A. Tsafiriri and N. Denkel, 233, (1989).

Hanukoglu, I. and Z. Hanukoglu. *Euro. J. Biochem.* 157 (1986): 27.

Harris Jr., E.D., H.G. Welgus, and S.M. Krane. *Collagen Rel. Res.* 4 (1984): 493.

Heath, J.K., M. Cowen, M.C. Mikel, and J.J. Reynold. *J. Periodontal Res.* 17 (1982): 183.

Hedin, L., R.J. Rodgers, E.R. Simpson, and J.S. Richards. *Biol. Reprod.* 37 (1987): 211.

Hernandez, E.R., A. Hurwitz, L. Botero, E. Ricciarelle, H. Werber, C.T. Roberts, D. LeRoith, and E.Y. Adashi. *Mol. Endocrinol.* 5 (1991): 1799.

Hernandez, E.R., C.T. Robertx, D. LeRoith, and E.Y. Adashi. *Endocrinology* 125 (1989): 572.

Hsu, C.-J. and J.M. Hammond. *Endocrinology* 120 (1987): 198.

Hsu, S., L. Raine, and H. Fanger. *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981): 577.

Hsueh, A.J.W., E.Y. Adashi, P.B.C. Joens, and J. Thomas H. Welsh. *Endcri. Rev.* 5 (1984): 76.

Hsueh, A.J.W., E.Y. Adashi, P.B.C. Jones, and T.H. Welsh Jr. *Endcri. Rev.* 5 (1984): 76.

Hsueh, A.J.W. and G.F. Erickson. *Science* 204 (1979): 854.

Hsueh, A.J.W. and N.C. Ling. *Life Sci.* 25 (1979): 1223.

Hsueh, A.J.W., C. Wang, and G.F. Erickson. *Endocrinology* 106 (1980): 1697.

Johnson, R.G. and J.D. Sheridan. *Science (Wash. DC)* 174 (1971): 717.

Jones, P.B.C., T.H. Welsh Jr., and A.J.W. Hsueh. *J. Biol. Chem.* 257 (1982): 11268.

Kawabe, T.T. and T.J.R.e. al. *Development* 111 (1991): 877.

Klinken, S.P. and P.M. Stevenson. *Eur. J. Biochem.* 81 (1977): 327.

Knecht, M. and K.J. Catt. *J. Biol. Chem.* 258 (1983): 2789.

Knobil, E. and J. Neill. "The Physiology of Reproduction". New York: Raven Press., (1988).

Kohan, S., B. Froya, E. Cederlund, T. Fairwell, R. Lerner, J. Johansson, S. Khan, M. Ritzen, H. Jornvall, S. Cekan, and E. Diczfalusy. *FEBS Lett.* 199 (1986): 242.

LaPolt, P.S., G.N. Piquette, D. Soto, C. Sincich, and A.J.W. Hsueh. *Endocrinology* 127 (1990): 823.

Liu, X.-J., M. Malkowski, Y. Guo, G.F. Erickson, S. Shimasaki, and N. Ling. *Endocrinology* 132 (1993): 1176.

Loosfelt, H., M. Misrahi, M. Atger, R. Saleasc, M.T.V.H.-L. Thi, A. Jolivet, A. Guidochon-Mantel, S. Sar, B. Jallal, J. Garnier, and E. Milgrom. *Science* 245 (1989): 525.

March, J.M. *Biol. Reprod.* 14 (1976): 30.

Maurer, H.R. "Towards serum-free, chemically defined media for mammalian cell culture". In *Animal Cell Culture. A Practical Approach*, ed. R. I. Freshney., New York: IRL press, (1992).

May, J.V., K. McCarty Jr., L.E. Reichert Jr., and D.W. Shomberg. *Endocrinology* 107 (1980): 1041.

Mayo, K.E., G.M. Cerelli, J. Spiess, J. Rivier, M.G. Rosenfeld, R.M. Evans, and W. Vale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83 (1986): 5849.

Mbikay, M., C.G. Linard, F. Sirois, C. Lazure, N.G. Seidah, and M. Chretien. *Cell. Mol. Biol.* 34 (1988): 387.

Mbikay, M., S. Nolet, S. Fournier, S. Benjannet, P. Chapdelaine, G. Paradis, J.Y. Dube, R. Tremblay, C. Lazure, N.G. Seidah, and M. Chretien. *DNA* 6 (1987): 23.

McFarlad, K.C., R. Sprengel, H.S. Phillips, M. Kohler, N. Rosembli, K. Nikolics, D.L. Segaloff, and P.H. Seeburg. *Science* 245 (1989): 494.

Merc, F.B., C.R. Botticelli, and J.T. Albright. *Endocrinology* 90 (1972): 992.

Midgley, A.R., Jr. *Adv. Exp. Biol. Med.* 36 (1973): 365.

Miller, W.L. *Endcri. Rev.* 9 (1988): 295.

Mondschein, J.S., S.A. Smith, and J.M. Hammond. *Endocrinology* 127 (1990): 2298.

Motlik, J., N. Crozet, and J. Fulka. *J. Reprod. Fert.* 72 (1984): 323.

Nagase, H. *BIOMedica* 7 (1992): 597.

Nakano, R., K. Sasaki, K. Shima, and S. Kitayama. *Exper. Clin. Endocrinol.* 81 (1983): 17.

Navickis, R.J., P.B.C. Jones, and A.J.W. Hsueh. *Mol. Cell. Endocrinol.* 27 (1982): 77.

Nolet, S., M. Mbikay, and M. Chretien. *Biochimica et Biophysica Acta* 1089 (1991): 247.

Nomura, S., B.L. Horgan, A.J. Wills, J.K. Heath, and D.R. Edwards. *Development* 105 (1989): 575.

Oliver, J.E., T.J. Aitman, J.F. Powell, C.A. Wilson, and R.N. Clayton. *Endocrinology* 124 (1989): 2671.

Orly, J., G. Sato, and G.F. Erickson. *Cell* 20 (1980): 817.

Otska, K., J. Sadek, and H. Limeback. *Eur. J. Biochem.* 145 (1984): 123.

Oury, F. and J.-M. Darbon. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156 (1988): 634.

Parmentier, M., F. Libert, C. Maenhart, A. Lefort, C. Gerard, J. Perret, J. VanSande, J. Dumont, and G. Vassart. *Science* 248 (1989): 1620.

Pelletier, G., C. Seguin, D. Dube, and R. St.-Arnoud. *Biology of Reproduction (Suppl)* 26 (1982): 151.

Pieper, D.R., J. Richard, and J.C. Marshall. *Endocrinology* 108 (1981): 1148.

Pilgrim, L. U. *Georgia Research Reporter* 9 (1977): 6.

Podgers, R.J., M.R. Waterman, and E.R. Simpson. *Endocrinology* 118 (1986): 1366.

Racowsky, C. and K.V. Baldwin. *Dev. Biol.* 134 (1989): 297.

Rani, C.S.S., A.R. Salhanick, and D.T. Armstrong. *Endocrinology* 108 (1981): 1379.

Ranta, T., M. Knecht, J. Darbon, A. Baukal, and K.J. Catt. In "Proceeding of the Fifth Ovarian Workshop (Oovarian Workshops, Champagne, IL)" in edited by R. J. Ryan and D. O.Toft, (1985): 125.

Ranta, T., M. Knecht, M. Kody, and K.J. Catt. *Mol. Cell. Endocrinol.* 27 (1981): 233.

Rao, M.C., J.S. Richards, A.R.J. Midgley, and L.E.J. Reichert. *Endocrinology* 101 (1977): 507.

Recowsky, C. and R.A. Satterlie. *Dev. Biol.* 108 (1985): 191.

Reich, R., A. Tsafiriri, and G.L. Mechanic. *Endocrinology* 116 (1985): 522.

Richards, J.S. and L. Hedin. *Annu. Rev. Physiol* 50 (1988): 441.

Richards, J.S., J.J. Ireland, M.C. Rao, G.A. Bernath, A.R. Midgley Jr., and L.E. Richert Jr. *Endocrinology* 99 (1976): 1562.

Richards, J.S., T. Jahnsen, L. Hedn, J. Lifka, S. Ratoosh, J.M. Durica, and N.B. Goldring. *Recent Prog. Horm. Res.* 43 (1987): 231.

Richards, J.S. and A.R. Midgley Jr. *Biol. Reprod.* 14 (1976): 82.

Richards, J.S. and J.J. Williams. *Endocrinology* 99 (1976): 1571.

Rieske, E., P. Schubert, and G.W. Kreutzberg. *Brain Res.* 84 (1975): 365.

Rivier, C., J. Rivier, and W. Vale. *Science* 234 (1986): 205.

Rivier, C. and W. Vale. *Endocrinology* 125 (1989): 152.

Rodgers, R.J., M.R. Waterman, and M.R. Simpson. *Mol. Endocrinol.* 1 (1987): 274.

Rolland, R. and J.M. Hammond. *Endocrinol. Res. Commun.* 2 (1975): 281.

Salckmann, R.L., T.E. Curry, R.D. Koos, and W.J. LiMaire. In "Program of the 68th Annual Meeting of The Endocrine Society" in Anaheim, CA.(1986)

Sandberg, K., H. Ji, T. Iida, and K.J. Catt. *J. Cell. Biol.* 117 (1992): 157.

Sarthy, P.V., S.M. Johnson, and P.B. Detewiler. *J.Comp.Neur* 206 (1982): 371.

Sato, E., T. Ishibashi, and A. Iritani. "Meiotic arrestin substance separated from porcine ovarian granulosa cells and hypothetical arresting mechanism of meiosis". In *Intraovarian control Mechanisms*, ed. C. P. Channing and S. J. Segal. New York: Plenum Press, (1982): 161

Sato, E. and S.S. Koide. *Differentiation* 26 (1984): 59.

Sato, E., H. Ueno, and S.S. Koide. *Gamete Res.* 13 (1986): 115.

Sellers, A. and G. Murphy. *Int. Rev. Connect. Tissue Res.* 9 (1981): 151.

Sellers, A., G. Murphy, M.C. Mikel, and J.J. Reynolds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 87 (1979): 581.

Sherizly, I., D. Galiani, and N. Dekel. *Human Reprod. (Eynsham)* 3 (1988): 761.

Shinohara, O., M. Knecht, and K.J. Catt. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82 (1985): 8518.

Simpson, E.R. and M.R. Waterman. *Annu. Rev. Physiol* 50 (1988): 427.

Simpson, I., B. Rose, and W.R. Loewenstein. *Science (Wash. DC)* 195 (1977): 294.

Sirard, M.A. and S. Bilodeau. *Biol. Reprod.* 43 (1990): 777.

Sirard, M.A. and L. First. *Biol. Reprod.* 39 (1988): 229.

Solano, A.R., A.G. Vela, K.J. Catt, and M.L. Dufau. *FEBS Lett.* 122 (1980): 184.

Sprengel, R., T. Braun, K. Nikolics, D.L. Segaloff, and P.H. Seeburg. *Mol. Endocrinol.* 4 (1990): 525.

Stone, S.L., S.H. Pomerantz, A. Schwartz-Kripner, and C.P. Channing. *Biol. Reprod.* 19 (1978): 585.

Stricklin, G.P. and H.G. Welgus. *J. Biol. Chem.* 258 (1983): 12252.

Tanaka, T., N. Andoh, T. Takeya, and E. Sato. *Mol. Cell. Endocrinol.* 83 (1992): 65.

Tanaka, T., E. Sato, T. Takeya, and K. Itahana. *Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ.* 71 (1993): 306.

Toaff, M.E., J.F.I. Stauss, and J.M. Hammond. *Endocrinology* 112 (1983): 1156.

Tsafriri, A. *Biol. Fertil.* 1 (1985): 221.

Tsafriri, A. and S. Bar-Ami. In "Intraovarian control Mechanisms", ed. C. P. Channing and S. J. Segal. New York: Plenum Press, (1982):145

Tsafriri, A. and C.P. Channing. *Endocrinology* 96 (1975): 922.

Tuckey, R.C., Z. Kostadinovic, and P.M. Stevenson. *J. Steroid Biochem.* 31 (1988): 201.

Turner, I.M., P.T.K. Saunders, S. Shimasaki, and S.G. Hillier. *Endocrinology* 125 (1989): 2790.

Ulvassback, M., C. Lindstrom, H. Weiber, P.-A. Abrahamsson, H. Lilija, and A. Lundwall. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (1989): 1310.

Vaitukaitis, J.L., C.Y. Lee, E.R. Ebersole, and A.C. Lerario. *Endocrinology* 97 (1975): 215.

Wang, C., A.J.W. Hsue, and G.F. Erickson. *J. Biol. Chem.* 254 (1979): 11330.

Wasserman, P.M., W.J. Josefowicz, and G.E. Letourneau. *J. Cell Sci.* 22 (1976): 531.

Welgus, H.G., E.J. Campbell, Z. Bar-Shavit, R.M. Senior, and S.L. Teitelbaum. *J. Clin. Invest.* 76 (1985): 219.

Welgus, H.G., J.J. Jeffrey, A.Z. Eisen, W.T. Roswit, and G.P. Stricklin. *Collagen Rel. Res.* 5 (1985): 167.

Welgus, H.G. and G.P. Stricklin. *J. Biol. Chem.* 258 (1983): 12259.

Welgus, H.G., G.P. Stricklin, A.Z. Eisin, E.A. Bauer, R.V. Cooney, and J.J. Jeffrey. *J. Biol. Chem.* 254 (1979): 1938.

Woodruff, T., H. Meunier, P.B. Jones, A.J.W. Hsueh, and K.E. Mayo. *Mol. Endocrinol.* 1 (1987): 561.

Wooley, D.E. "Extracellular Matrix Biochemistry". ed. K. A. Piez and A. H. Reddi. New York: Elsevier Science Publishing, (1984).

Ying, S.-Y. *Endocr. Rev.* 9 (1988): 267.

Young, I.G. and S. Anderson. *GENE* 12 (1980): 257.

Zelevnik, A.J., A.R. Midgley Jr., and L.E. Reichert Jr. *Endocrinology* 95 (1974): 818.

Zhou, J., E. Chin, and C. Bondy. *Endocrinology* 129 (1991): 3281.

Zlotkin, T., Y. Farkash, and J. Orly. *Endocrinology* 119 (1986): 2809.

Zor, U. Endcri. Rev. 4 (1983): 1.

加藤嘉太郎. 家畜比較解剖図説. 養賢出版, (1974).

村松正実, 岡山博人. 実験医学別冊 遺伝子工学ハンドブック. 東京: 洋土社, (1991).

中野良介. 卵巣の内分泌学. 東京: 診断と治療社, (1990).

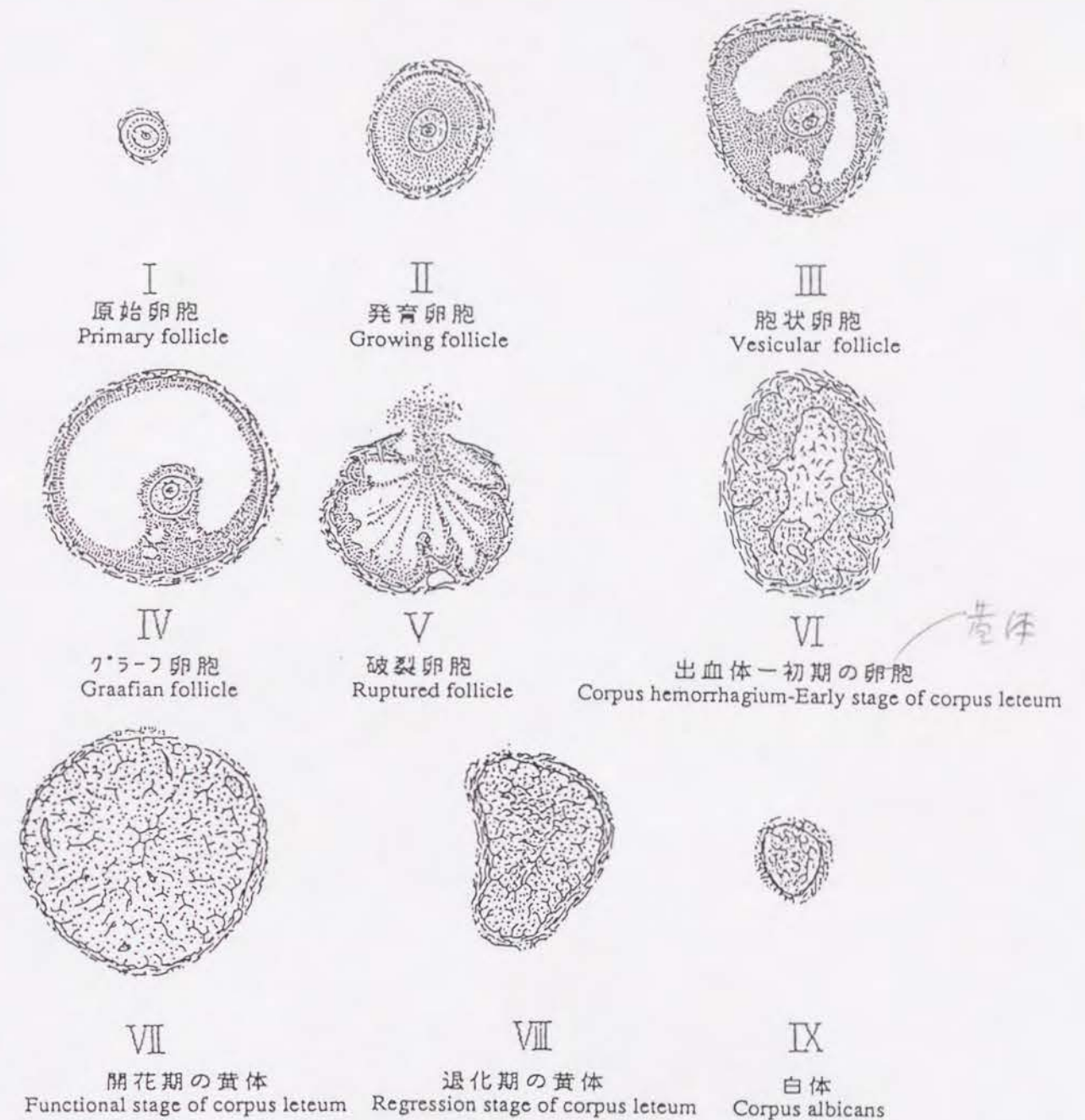


図1 卵胞と黄体の発達過程。

- I: 単層で扁平な卵胞細胞が卵母細胞を取り囲み、原始卵胞を形成する。
- II: 卵胞内の卵母細胞は卵黄を蓄積して至大に肥大する。同時に卵胞細胞も分裂増殖して卵母細胞を囲んで重層状に配列し、顆粒膜細胞層を形成、発育卵胞となる。
- III: 発育卵胞がさらに成長すると、顆粒膜細胞の間に隙間ができて卵胞液がたまり、胞状卵胞を形成する。
- IV: 次第に著明な半透明囊状の卵胞として卵巣表面に隆起し、グラーフ卵胞を形成する。この状態では、卵母細胞は卵胞腔に突出するようになる。さらに、LH(黄体形成ホルモン)の作用を受けて、卵成熟が開始する。
- V: グラーフ卵胞が益々膨大し、卵胞壁も薄く半透明になってくると、卵胞液の内圧により、卵胞の一部が破れ、卵母細胞は卵胞液と共に卵巣外に流出する。
- VI: 排卵にともなって、顆粒膜細胞が増殖を開始する。
- VII: 顆粒膜細胞が、大きさ形態共に異なった黄体細胞へと分化すると共にし、結組織が血管を伴って黄体細胞の間に樹枝状に進入し、黄体が完成する。
- VIII: 排卵された卵が受精されない場合、黄体は退化をはじめ、中心部の黄体細胞から急速に壊死が始まる。
- IX: 残った黄体細胞は脂肪変成し白色になるので白体といわれる。実質部分は結合組織と入れ変わって次第に硬く萎縮して、やがて消失する。

図2 今回用いたブタの卵巢（写真左）とその組織像（写真右）

卵巢はブアン液で固定し、ハードパラフィンに包埋し $5\mu\text{m}$ の薄切切片を作成、Masson-Goldner法により染色して観察した。

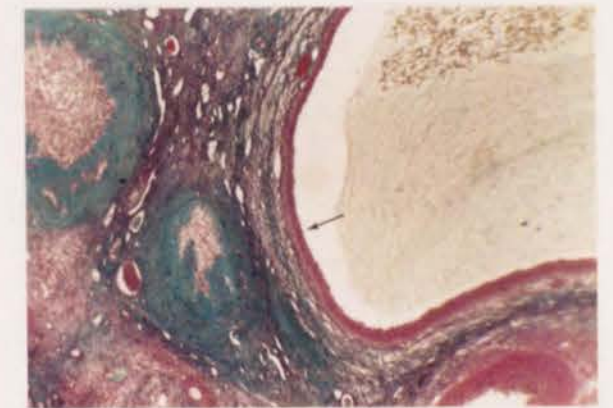
顆粒膜細胞: aの卵巢に観察される卵胞を破って分離した。顆粒膜細胞（写真a右、矢印）は卵胞周囲に配列している。なお写真b、c、dに観察される卵胞の顆粒膜細胞は使用していない。

初期の黄体: bの卵巢に観察される黄体（矢印）を分離して用いた。黄体周囲には厚い皮膜がみられる（b右）が、黄体採取に際して除去し、内腔液を含む黄体組織を初期の黄体とした。

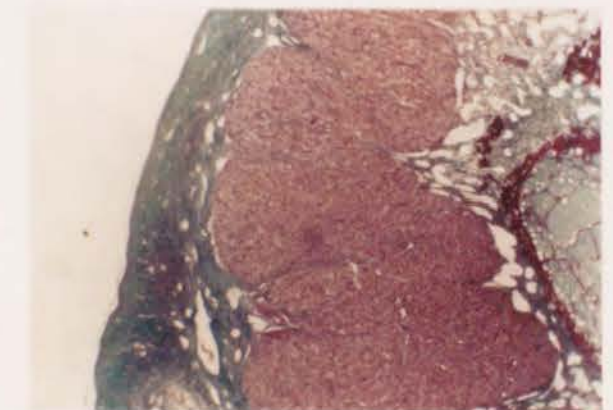
開花期の黄体: cの卵巢に観察される黄体を分離して用いた。黄体採取に際して黄体周囲の皮膜（c右）は除去したので、今回用いた開花期の黄体は内部の黄体組織を中心とした組織からなる。

白体: dの卵巢の白体から組織を分離した。黄体と同様に皮膜は除去して内部の組織を採取し、白体とした。

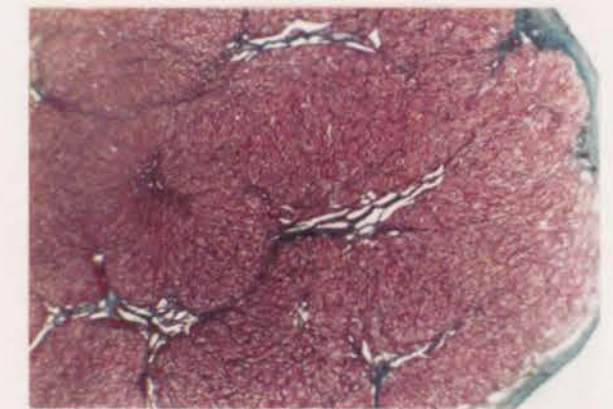
a



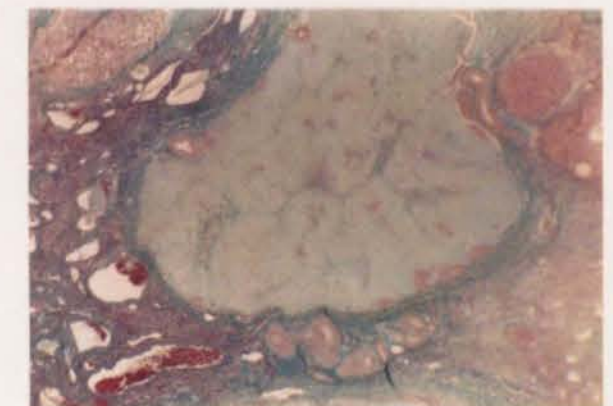
b



c



d



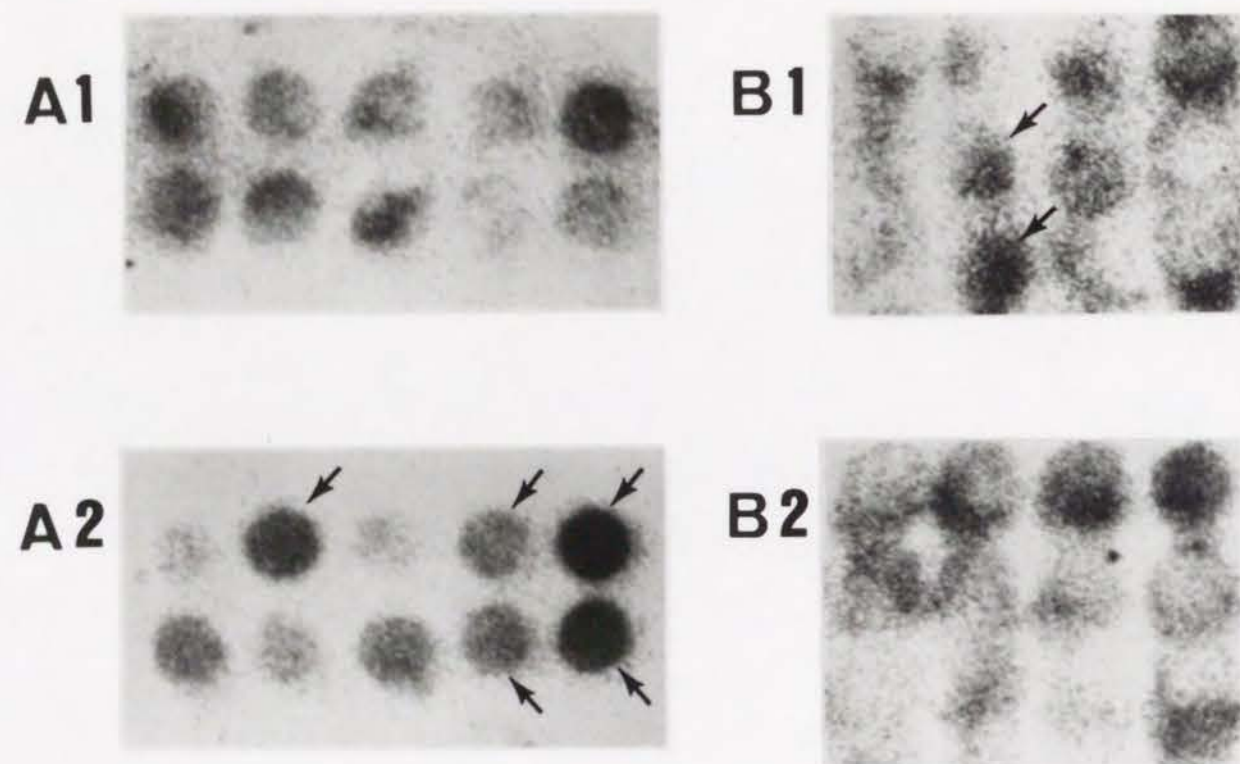


図3 Modified Plaque Hybridization の結果。

1: 顆粒膜細胞由来のプロープを使用したもの。

2: 黄体由来のプロープを使用したもの。

A: 黄体特異的な発現のみられるクローンの例を示す。矢印上段右よりTS534、TS535、TS537。下段右よりTS539、TS540。

B: 顆粒膜細胞特異的な発現のみられるクローン（上:TS021.下:TS027）の例を示す。

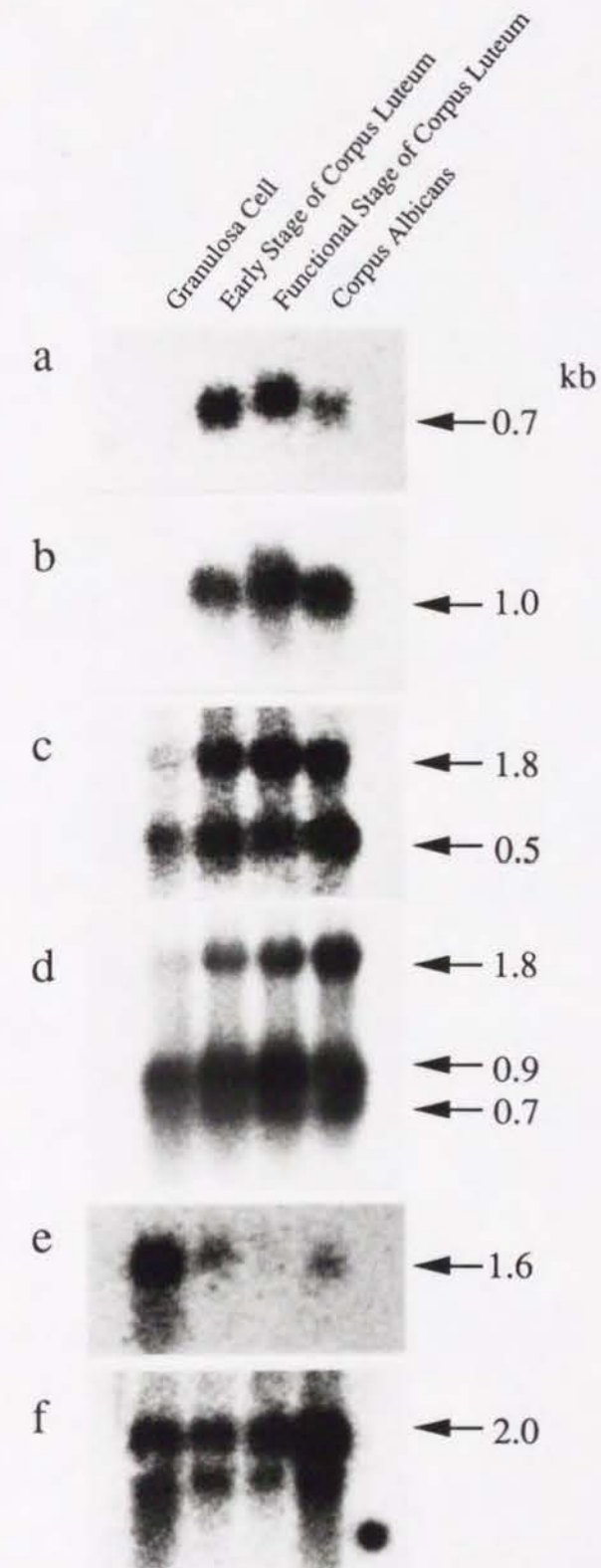


図4 Northern Hybridizationの結果を示す。

Modified Plaque Hybridizationにより、顆粒膜細胞、または黄体特異的な発現が認められたクローンについて、Northern Hybridizationを行った。右端の矢印では、18S および28S ribosomal RNAの位置より推定された各mRNAの大きさを示す。a、b、c、dの4クローンでは、黄体特異的な発現がみられる（a: TS543、b: TS507、c: TS537、d: TS049）。一方、eのクローンでは顆粒膜細胞特異的な発現が確認できる（e: TS052）。fは、コントロールとして β -actinをプロープとして用いた。

1	GGCACGAGCGGC ATG AGC CCC TTT GCA CCC CTG GCC TCT GGC ATC CTG	48
(1)	Met Ser Pro Phe Ala Pro Leu Ala Ser Gly Ile Leu	(12)
49	CTG CTG CTG TGG CTG ACT GCC CCC AGC CGA GCC TGT ACC TGC GTC CCA	96
(13)	Leu Leu Leu Trp Leu Thr Ala Pro Ser Arg Ala Cys Thr Cys Val Pro	(28)
97	CCC CAC CCA CAG ACG GCC TTC TGC AGC TCC GAC CTG GTC ATC AGG GCC	144
(29)	Pro His Pro Gln Thr Ala Phe Cys Ser Ser Asp Leu Val Ile Arg Ala	(44)
145	AAG TTT GTG GGA GCC CCA GAG TTC AAC CAG ACC GCC TCG TAC AAG CGT	194
(45)	Lys Phe Val Gly Ala Pro Glu Phe Asn Gln Thr Ala Ser Tyr Lys Arg	(60)
193	TAT GAG ATC AAG ATG ACC AAG ATG TTC AAA GGG TTC AAT GCC TTG GGG	240
(61)	Tyr Glu Ile Lys Met Thr Lys Met Phe Lys Gly Phe Asn Ala Leu Gly	(76)
241	GAT GCC CCT GAC ATC CGG TTC ATC TAC ACC CCC GCC ATG GAG AGC GTC	288
(77)	Asp Ala Pro Asp Ile Arg Phe Ile Tyr Thr Pro Ala Met Glu Ser Val	(92)
289	TGC GGA TAC TTC CAC AGG TCC CAG AAC CGC AGC CAG GAG TTT CTC ATA	336
(93)	Cys Gly Tyr Phe His Arg Ser Gln Asn Arg Ser Gln Glu Phe Leu Ile	(108)
337	GCT GGA CAA CTG TGG AAC GGG CAC CTG CAC ATC ACC ACC TGC AGT TTT	384
(109)	Ala Gly Gln Leu Trp Asn Gly His Leu His Ile Thr Thr Cys Ser Phe	(124)
385	GTG GCT CCC TGG AAC AGT CTG AGC TCA GCT CAG CGC CAG GGC TTC ACC	432
(125)	Val Ala Pro Trp Asn Ser Leu Ser Ser Ala Gln Arg Gln Gly Phe Thr	(140)
433	GAG ATC TAT GCT GCT GGC TGT GAG GAA TGC ACA GTG TTT CCC TGC ACA	480
(141)	Glu Ile Tyr Ala Ala Gly Cys Glu Glu Cys Thr Val Phe Pro Cys Thr	(156)
481	TCC ATC CCC TGC AAA CTG CAG AGT GAC ACT CAC TGC TTG TGG ACA GAC	528
(157)	Ser Ile Pro Cys Lys Leu Gln Ser Asp Thr His Cys Leu Trp Thr Asp	(172)
529	CAG CTC CTC ACA GGC TCT GAC AAG GGC TTC CAG AGC CGC CAC CTT GCC	576
(173)	Gln Leu Leu Thr Gly Ser Asp Lys Gly Phe Gln Ser Arg His Leu Ala	(188)
577	TGC ATG CCC CGG GAG CCA GGA ATG TGC ACC TGG CAG TCC TTG CGG CCC	624
(189)	Cys Met Pro Arg Glu Pro Gly Met Cys Thr Trp Gln Ser Leu Arg Pro	(204)
625	CGG GTG GCC TGA ATCCTGCGCCAGCAGAGCCGAAACCTGCACAGTGTTCACCTCTCT	683
(205)	Arg Val Ala ***	(207)
684	TCCCGCTCCACCTGTCTTTCTCCAAGATGATGA <u>ATAA</u> GAACCTCGTGCC	735

a

	10	20	30	40	50	60
TS543	AGCGGCATGAGCCCTTTGCACCCCTGGCCTCTGGCATCCTGCTGCTGTGGCTGACT					
	:: :::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: :::::::::: ::					
Collagenase	CGCACCATGGCCCTTTGCACCCATGGCCTCTGGCATCCTGTTGCTGCTGTGGCTCACA					
Inhibitor	10	20	30	40	50	60
	70	80	90	100	110	120
	GCCCCAGCCGAGCCTGTACCTGCGTCCCACCCACCCACAGACGGCCTTCTGCAGCTCC					
	:: ::::					
	GCCCCAGCCGAGCCTGTACCTGCGTCCCACCCACCCACAGACGGCCTTCTGCAACTCC					
	70	80	90	100	110	120
	130	140	150	160	170	180
	GACCTGGTCATCAGGGCCAAGTTTGTGGGAGCCCCAGAGTTCAACCAGACCGCCTCGTAC					
	:: : :::::::::: :::: :: :::: :::: : :: :::: :::					
	GATGTCGTCATCAGGGCCAAGTTCGTGGGGACCGCAGAAGTCAATGAAACTGCCTTATAC					
	130	140	150	160	170	180
	190	200	210	220	230	240
	AAGCGTTATGAGATCAAGATGACCAAGATGTTCAAAGGGTTCAATGCCTTGGGGGATGCC					
	:: ::::					
	CAGCGTTATGAGATCAAGATGACTAAGATGTTCAAAGGGTTCAGTGCCTTGAGGGATGCC					
	190	200	210	220	230	240
	250	260	270	280	290	300
	CCTGACATCCGGTTTCATCTACACCCCGCCATGGAGAGCGTCTGCGGATACTTCCACAGG					
	:: ::::					
	CCTGACATCCGGTTTCATCTACACCCCTGCCATGGAGAGCGTCTGCGGATACTTCCACAGG					
	250	260	270	280	290	300
	310	320	330	340	350	360
	TCCCAGAACCAGCAGGAGTTTCTCATAGCTGGACAATGTGGAACGGGCACCTGCAC					
	:::::::::::::::: :::::::::::::::::: :::: :::: :::::::::: ::::					
	TCCCAGAACCAGCAGTGAAGAGTTTCTCATAGCTGGACAATGTGGAATGGGCACCTGCAC					
	310	320	330	340	350	360
	370	380	390	400	410	420
	ATCACCACTGCAGTTTTGTGGCTCCCTGGAACAGTCTGAGCTCAGCTCAGCGCCAGGGC					
	:: :::: :: :::::::::: ::::					
	ATCACCACTGCAGTTTTGTGGCTCCCTGGAACAGCATGAGTTCTGCTCAGCGCCGGGGA					
	370	380	390	400	410	420
	430	440	450	460	470	480
	TTCACCGAGATCTATGCTGCTGGCTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCTGCACATCCATC					
	:::::: :: :::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::::: ::::::::::					
	TTCACCAAGACCTATGCTGCTGGTTGTGAGGAATGCACAGTGTTCCTGCTCATCCATC					
	430	440	450	460	470	480
	490	500	510	520	530	540
	CCCTGCAAACTGCAGAGTGACACTACTGCTTGTGGACAGACCAGCTCCTCACAGGCTCT					
	:::::::::::::::: :::::::::::::::::: :::::::::: :::::::::: ::::::::::					
	CCCTGCAAACTGCAGAGCGACACTACTGCTTGTGGACGACAGCTGCTCACAGGCTCT					
	490	500	510	520	530	540

図5 TS543 cDNAクローンの塩基配列と、そこから予想されるアミノ酸配列を示す。

下線部分は、polyA付加シグナルを示している。

また1番から23番のアミノ酸は細胞外への分泌に必要なリーダー配列であると考えられる (Carmichael et al., 1986)。

a

1	TT ATA ATA CCC ATC CAG TGA CGC ACA TGC CTG AAA GGA CTC CCG CTC	47
48	ATC ACA ATG AAA TTT CTT CTG GGC ACC CTC GTG GTC TTA GCC ACC TTT	95
(1)	Met Lys Phe Leu Leu Gly Thr Leu Val Val Leu Ala Thr Phe	(14)
96	GTG ACT TTA TGC AAC TCC CAG TGC TAT TTC ATA CCT AAT CAG AGC TTA	143
(15)	Val Thr Leu Cys Asn Ser Gln Cys Tyr Phe Ile Pro <u>Asn Gln Ser Leu</u>	(30)
144	AAA CCT AAT GAA TGC CAG GAT CTT AAA GGA GTC TCA CAC CCG CTG AAC	191
(31)	Lys Pro Asn Glu Cys Gln Asp Leu Lys Gly Val Ser His Pro Leu Asn	(46)
192	TCT GTG TGG AAG ACT AAA GAC TGT GAG GAG TGT ACT TGT GGC CAA AAT	239
(47)	Ser Val Trp Lys Thr Lys Asp Cys Glu Glu Cys Thr Cys Gly Gln Asn	(62)
240	GCG ATT AGC TGT TGC AAC ACT GCT GCC ATA CCT ACG GGT TAT GAC ACA	287
(63)	Ala Ile Ser Cys Cys Asn Thr Ala Ala Ile Pro Thr Gly Tyr Asp Thr	(78)
288	AAT AAG TGT CAG AAA ATC TTG AAC AAG AAG ACC TGC ACC TAT ACA GTG	335
(79)	Asn Lys Cys Gln Lys Ile Leu Asn Lys Lys Thr Cys Thr Tyr Thr Val	(94)
336	GTG GAA AAG AAG GAC CCA GGA AAG ACC TGT GAT GTC ACT GGA TGG GTA	383
(95)	Val Glu Lys Lys Asp Pro Gly Lys Thr Cys Asp Val Thr Gly Trp Val	(110)
384	TTA TAA TGT GTT TCT AGT GGG CCC AGA GCT CTC AGC CTG AGA GGG CCC	431
(111)	Leu ***	(112)
432	AAG TTC TCC CAT GCC AGG CCT CAT TCT CCT ATG GCC TCT AAC TGT CTA	479
480	TGA TTG TAC AAC CCT ACC TAT TAG TAA AAA ATT CTT GAG CAA ACA CTT	527
528	GAA	530

b

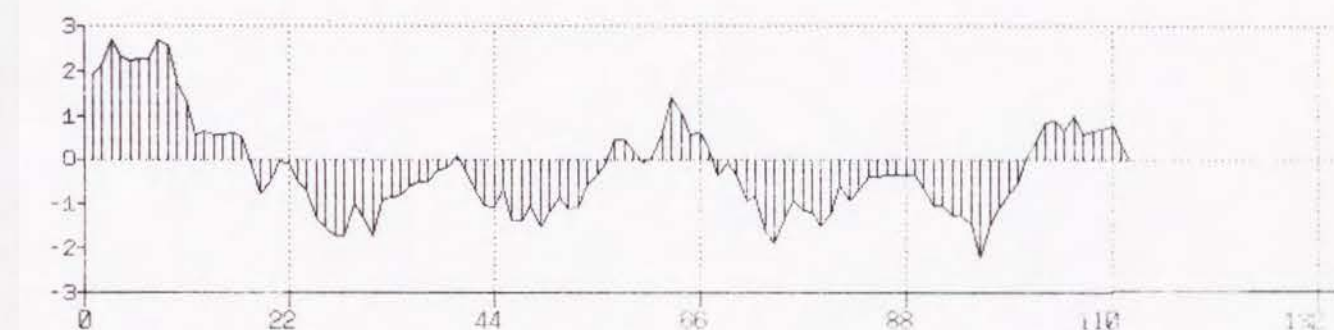


図8 a) TS507 cDNA クロンの全塩基配列とそれから予想されるアミノ酸配列。
下線部分はグリコシル化を受けると予想されるアミノ酸部分を示す。
b) 予想されるTS507 アミノ酸の配列に対して Hydrophobicity を調べた (Kyte
and Doolittle, 1982)。値が大きいほど疎水性が高いと考えられる。最下段の数字
はアミノ酸番号を示している。

a

	10	20	30	40	50	60
TS537	CTCAAACTCAAAACATAGCACCCCTTGAGAAATAAAATGAACGAAAATCTATTTGCGT					
	::::	::::	:	::::	::::	:
mtDNA	ACAAAAATATTAACAAAACACCCCTTGAGAAACAAAATGAACGAAAATTTATTTACCT					
	8260	8270	8280	8290	8300	8310
	70	80	90	100	110	120
	CTTTTATTGCCCCACGATAATAGGACTACCTATTGTACCTTAATTATTATATTTCCCAA					
	::::	::::	:	::::	:	:
	CTTTTATTACCCCTGTAATTTTAGGTCTCCCTCTCGTAACCCTTATCGTACTATTCCCAA					
	8320	8330	8340	8350	8360	8370
	130	140	150	160	170	
	GCTTACTATTCCCAACACCCAAACGACTCATTAATAACCGCACAAATCTCGATCC					
	:	:	:	:	:	:
	GCCTACTATTCCCAACATCAAACCGACTAGTAAGCAATCGCTTTGTAACCCCTCC					
	8380	8390	8400	8410	8420	

b

	10	20	30	40
TS537	MNENLFASFIAPTMMGLPIVTLIIMFPSLLFPTPKRLINNRTISI			
Bovine ATPase 6	-----T---T-VIL---L-----VL-----SN--VS--FVTL			
Human ATPase 6	-----IL---AAV---L--P--I--S-Y-----L-TT			

図 1 0 TS537 cDNA クローンのホモロジー検索の結果を示す。

a) TS537 cDNA の塩基配列とウシのミトコンドリア DNA (L-strand:

Anderson et al., 1982) との比較。コード領域の N 末端を含む塩基配列に対してホモロジー検索を行なった。H⁺-ATPase protein 6 のコード領域は mtDNA の塩基番号 8290 番から開始している。

b) TS537 cDNA の塩基配列から予想されるアミノ酸配列とウシとヒトのミトコンドリア ATPase protein 6 (Anderson et al., 1982) との比較。共にメチオニンから始まる N 末約 50 アミノ酸に対してホモロジーを調べた。同一のアミノ酸は "-" により表示してある。

a

	10	20	30	40	50
TS049	GGCACGAG--GTCCCATCCCTCGGTTTAAAAACAGATGCTATCCCAGGACGATTAAACCA				
	:	:	:	:	:
mtDNA	CTCATGAGCTGTGCCCTCTCTAGGACTAAAAACAGACGCAATCCCAGGCCGTCTAAACCA				
	7860	7870	7880	7890	7900
	60	70	80	90	100
	AACAACCTCTAATATCAACACGACCTGGCCTTTATTACGGACAGTGCTCAGAAATCTGTGG				
	::::	:	:	:	:
	AACAACCCCTTATATCGTCCCGTCCAGGCTTATATTACGGTCAATGCTCAGAAATTTGCGG				
	7920	7930	7940	7950	7960
	120	130	140	150	160
	ATCAAACCACAGCTTCATGCCCATTTGACTTGAACCTTGTCCTTAAAGTACTTCGAAAA				
	:	:	:	:	:
	GTCAAACCACAGTTTCATACCCATTGTCTTGTAGTTAGTCCCACTAAAGTACTTTGAAAA				
	7980	7990	8000	8010	8020
	180	190			
	ATGGTCAACATCAAT				
	:	:	:	:	:
	ATGATCTGCGTCAAT				
	8040	8050			

b

	10	20	30	40	50	60
TS049	HEVPSLGLKTDALPGRNLNQTTLMSRPGLYYGQCSEICGSNHSFMPFIVLELVPLKYFEKW					
	:	:	:	:	:	:
COII	WAVPSLGLKTDALPGRNLNQTTLISSRPGLYYGQCSEICGSNHSFIPFIVLELVPLKYFEKW					
	170	180	190	200	210	220
	STS					
	:	:	:	:	:	:
	SAS					

図 1 1 TS049 cDNA クローンのホモロジー検索。

a) TS049 の塩基配列とウシのミトコンドリア cytochrome c oxidase subunit II 遺伝子 (Anderson et al., 1982) との比較。コード領域の C 末端部分に対して行なった結果を示してある。

b) TS049 の塩基配列から予想されるアミノ酸配列をウシのミトコンドリア cytochrome c oxidase subunit II のアミノ酸配列と比較した。共に C 末端の約 60 アミノ酸に対して行なった。相同なアミノ酸残基を ":" により示している。

	86	96	106	116	126	136	146
TS052	CAACCTTCTCAGCCAGCACTGTGCCTGCATCTAAGGGTGTCCCGCTGGTGGCCAAGCTCCCACAGGCACC						
	:::~::~:						
Inhibin	CAACCTTCTCAGCCAGCACTGTGCCTGCATCTAAGGGTGTCCCGCTGGTGGCCAAGCTCCCACAGGCACC						
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	1150
	156	166	176	186	196	206	216
	AGCCTGGAGGAAGGCAGAGTTCCACCTCCCTTTTCCTTCGCGCTCTTCGCTGGAGGCTCCCTCCCTG						
	:::~::~:						
	AGCCTGGAGGAAGGCAGAGTTCCACCTCCCTTTTCCTTCGCGCTCTTCGCTGGAGGCTCCCTCCCTG						
	1160	1170	1180	1190	1200	1210	1220
	226	236	246	256	266		
	TCCGCCCTGTCCCATGGGTAATGTGACAATAAACAGCATAGTGCAGCTC						
	:::~::~:						
	TCCGCCCTGTCCCATGGGTAATGTGACAATAAACAGCATAGTGCAGATG						
	1230	1240	1250	1260	1270		

図12 TS052 cDNA クローンの塩基配列とブタのインヒビン α -サブユニット (Mayo et al., 1986) の塩基配列との比較。共に終止コドン (インヒビン α -サブユニットでは1114番に始まるTAA) を含む 3' 末端を示してある。相互間で一致しているヌクレオチド残基は ":" であらわしている。

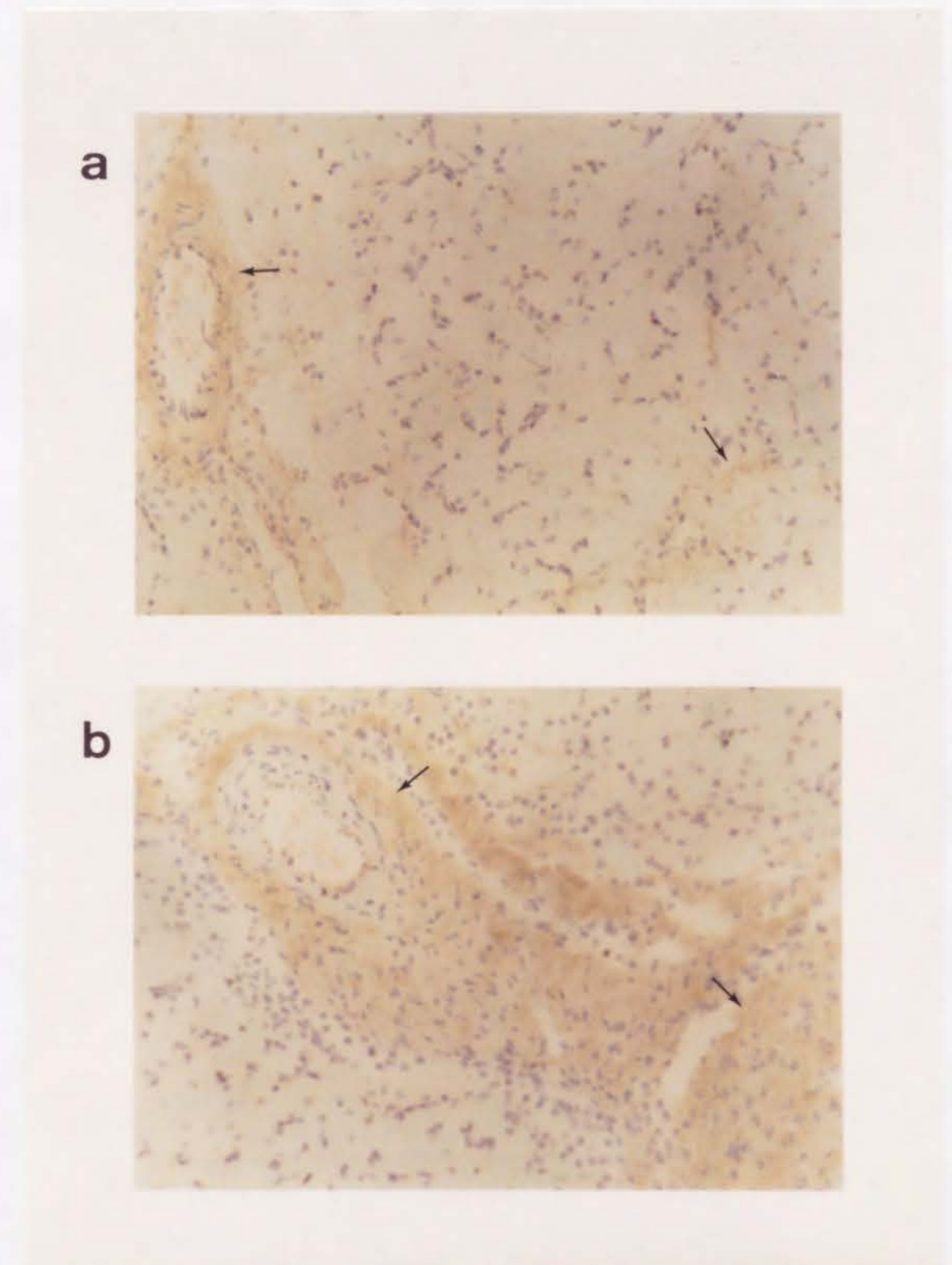


図13 コラゲナーゼインヒビターの免疫組織学的検出。
aは開花期の黄体組織の中央部を示す。血管や黄体細胞間に陽性反応がみられる。
bでは開花期の黄体組織の基底部を示す。血管や黄体組織の基底膜部分に陽性反応がみられる。

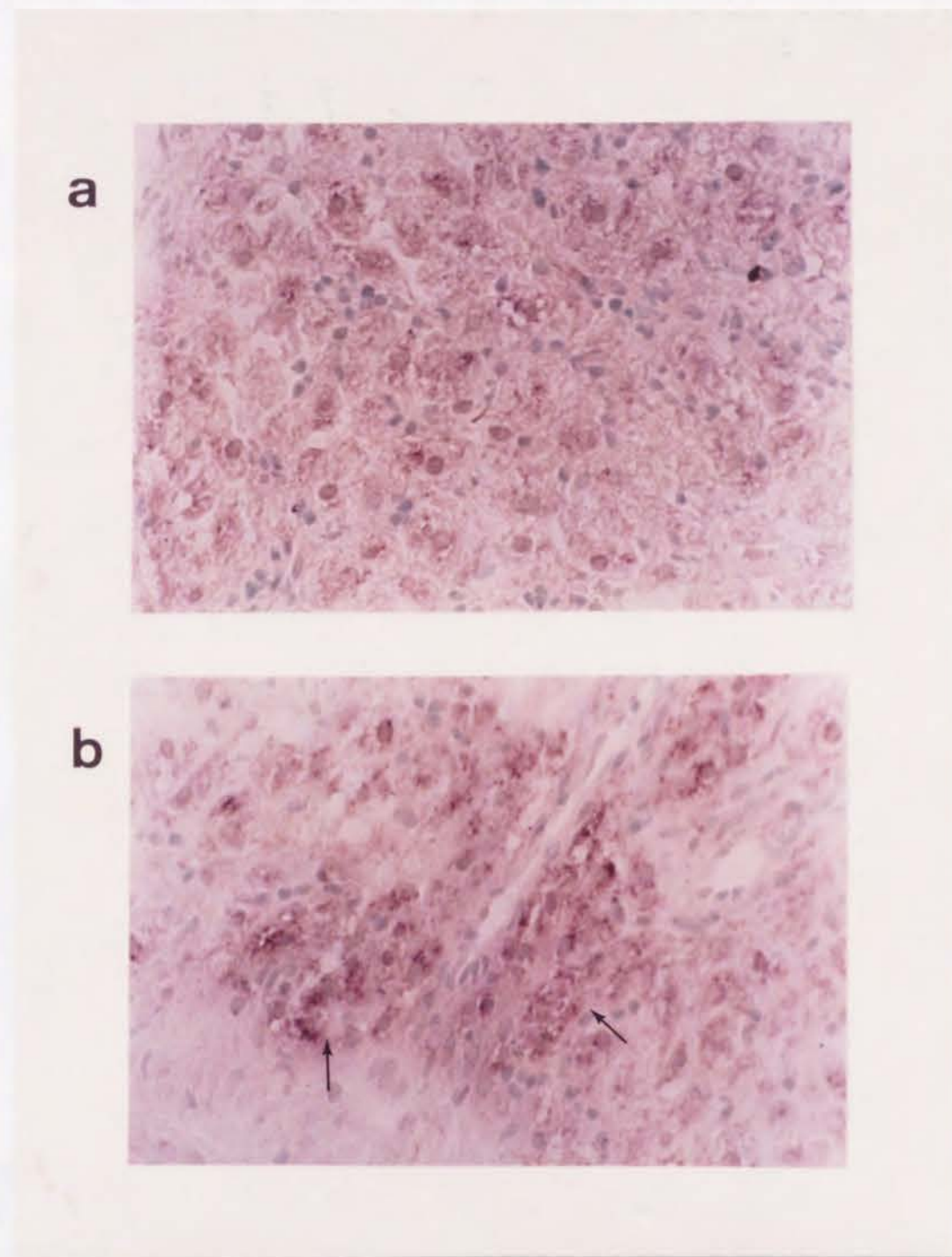


図14 TS507の発現組織の分析。

a は開花期の黄体組織の中央部を示す。黄体実質細胞に陽性反応がみられる。
b は開花期の黄体組織の基底部を示す。血管周囲の黄体実質細胞に特に強い陽性反応がみられる。左下の部分が基底膜に相当するが、コラゲナーゼインヒビターの場合と異なり基底膜部分には陽性反応はみられない。

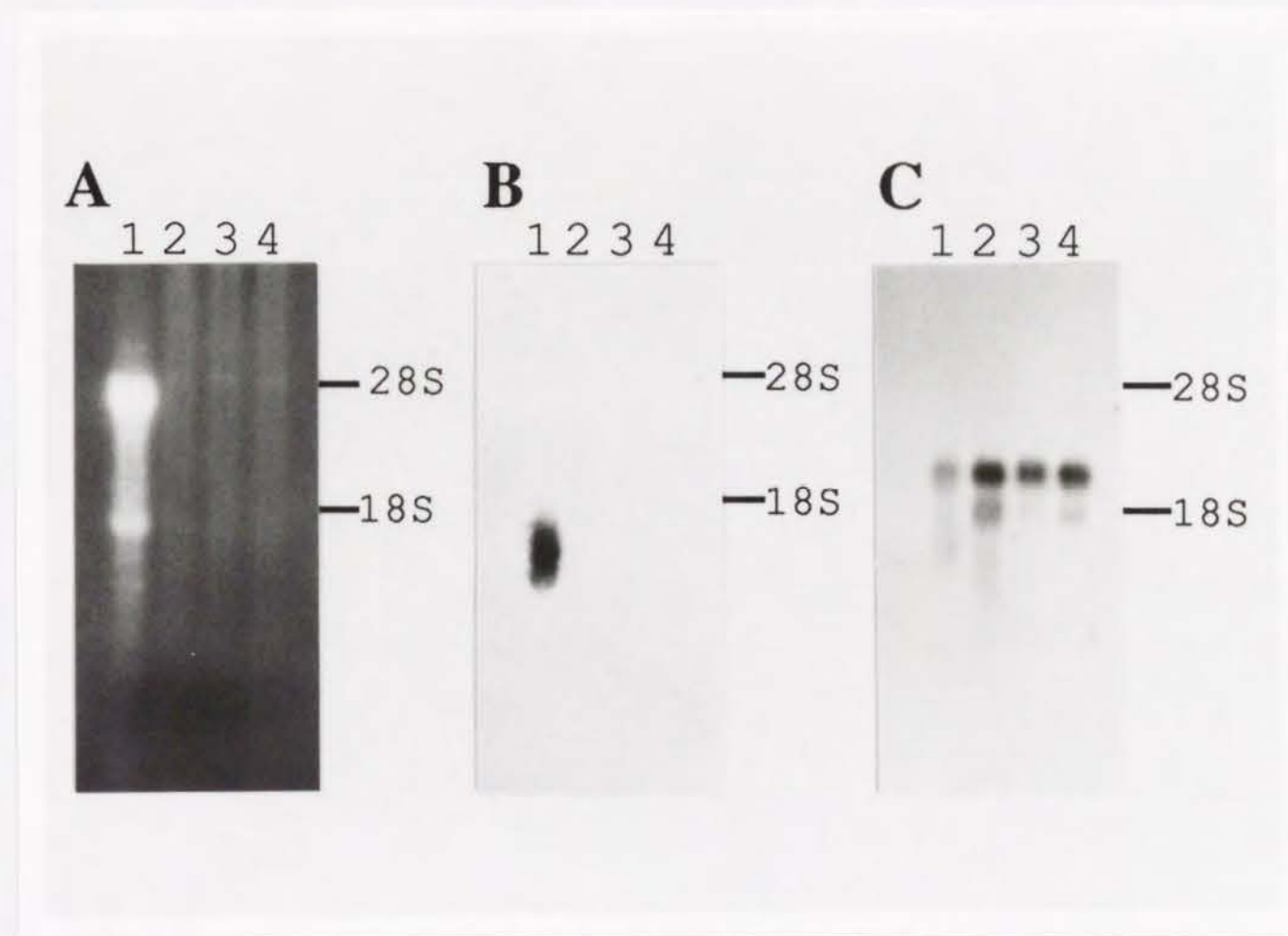


図15 ヒト生殖関連組織でのTS507の発現。

レーン1ではコントロールとして、ブタ開花期の黄体の total RNA を $10 \mu\text{g}$ 使用した。レーン2、レーン3、レーン4では、ヒト前立腺、ヒト精巣、ヒト卵巣の poly A⁺ RNA、 $2 \mu\text{g}$ をそれぞれ使用した。A) 使用した RNA の分解の程度と等量性をみるため電気泳動が終了した時点でエチジウムブロマイド染色を行なったもの。B) プロブとして TS507 cDNA を用いた。C) コントロールとして β -アクチン遺伝子をプロブとして用いた。

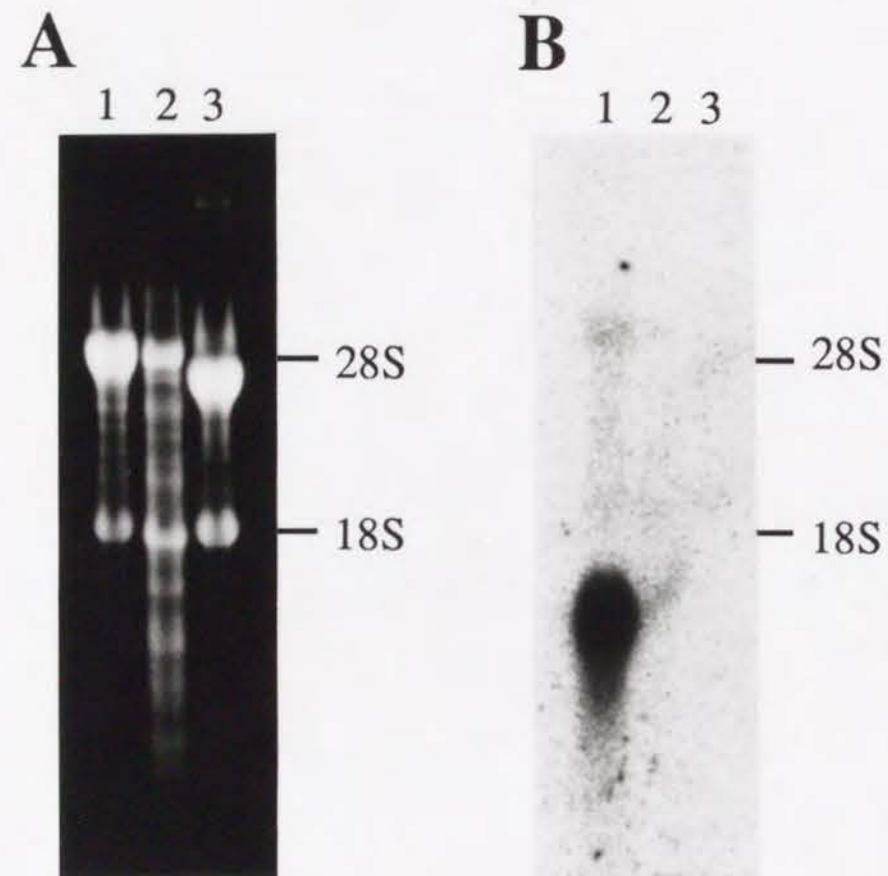


図16 プタ前立腺でのTS507の発現。

レーン1とレーン3では、コントロールとしてブタ開花期の黄体、トリ線維芽細胞の total RNA をそれぞれ $10 \mu\text{g}$ 使用した。レーン2ではブタ前立腺の total RNA を $10 \mu\text{g}$ 使用した。A) 使用した RNA の分解の程度と等量性をみるため電気泳動が終了した時点でエチジウムブロマイド染色を行なった。B) プローブとして TS507 cDNA を用いた。

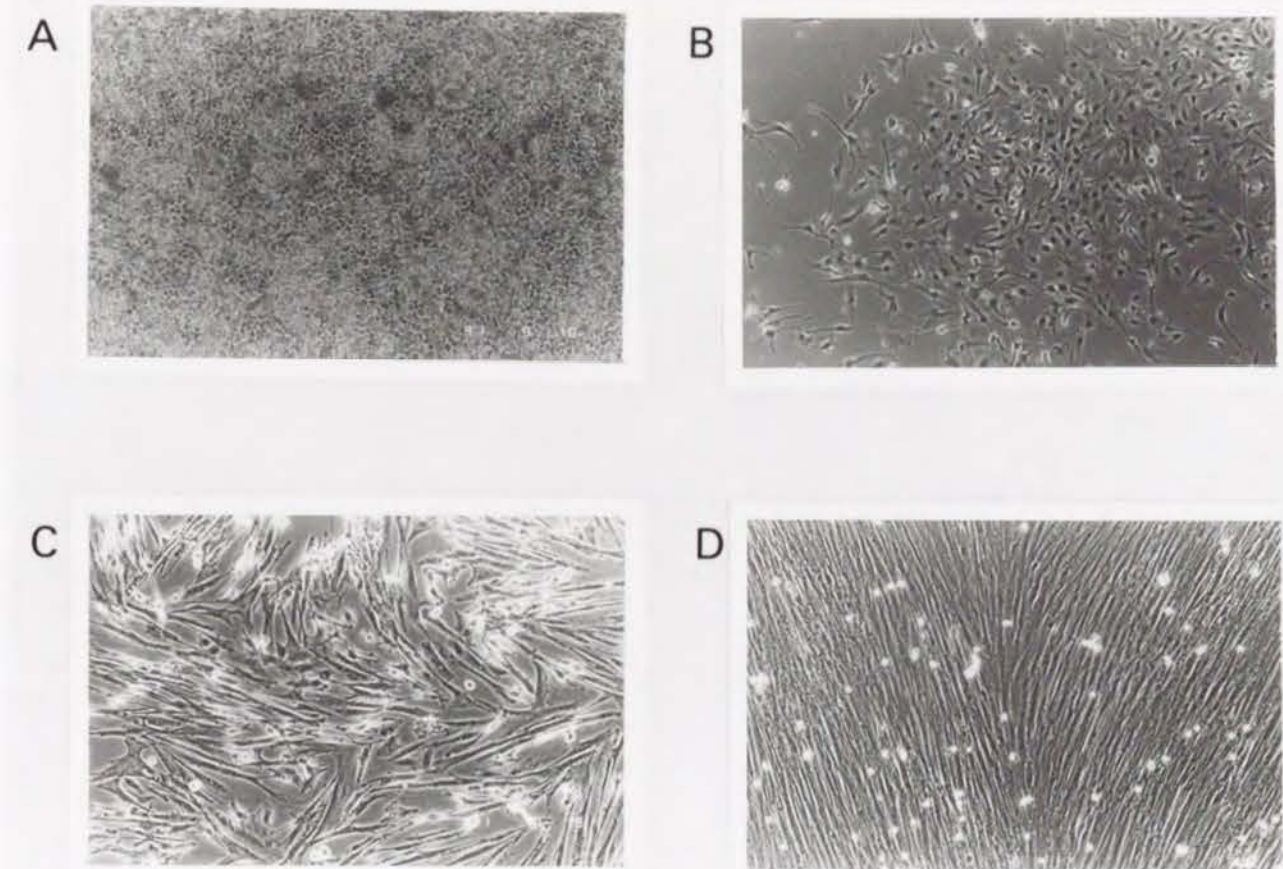


図17 初代培養顆粒膜細胞の形態。

- A: 卵巣から調製した顆粒膜細胞を、DEM培地 (8% FBS) で1日培養したもの。顆粒状の細胞が多数存在しているのが確認できる。(X25)
- B: 3日間培養をしたもの。(X25)
- C: 同様に10日間培養を続けたもの。細胞が繊維状に変化している。(X25)
- D: 約1ヶ月間培養を続けたもの。繊維状の細胞が同一方向に並び、層を形成する。(X25)

図18 単離した顆粒膜細胞株の形態。

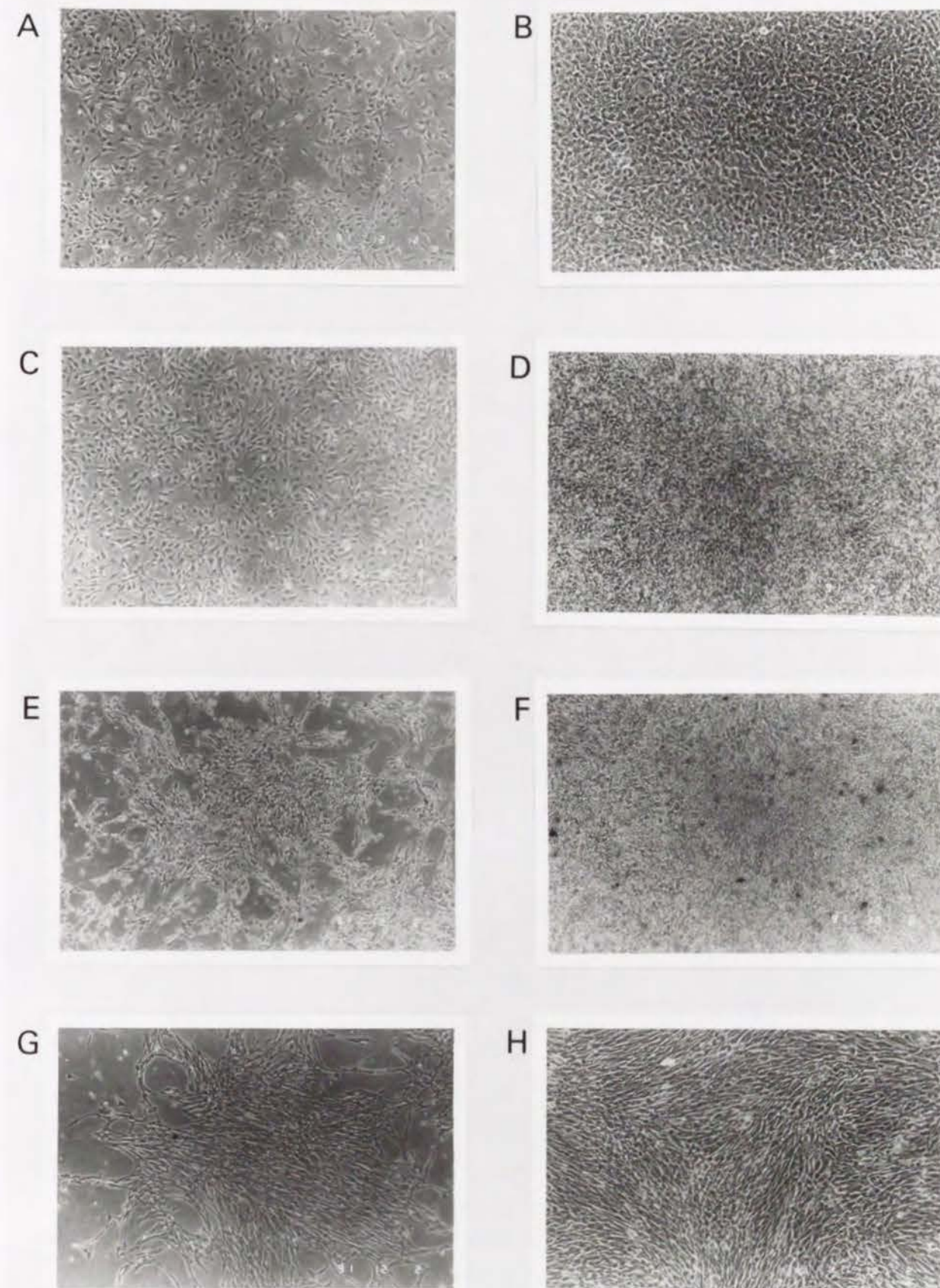
左側の列(A、C、E、G)は Dispersed cells の状態。右側の列(B、D、F、H)は
充分増殖した後(Confluent cells)の状態。

A, B: Src A

C, D: Src B

E, F: Large T/H-ras B1

G, H: Large T/H-ras D (X 25)



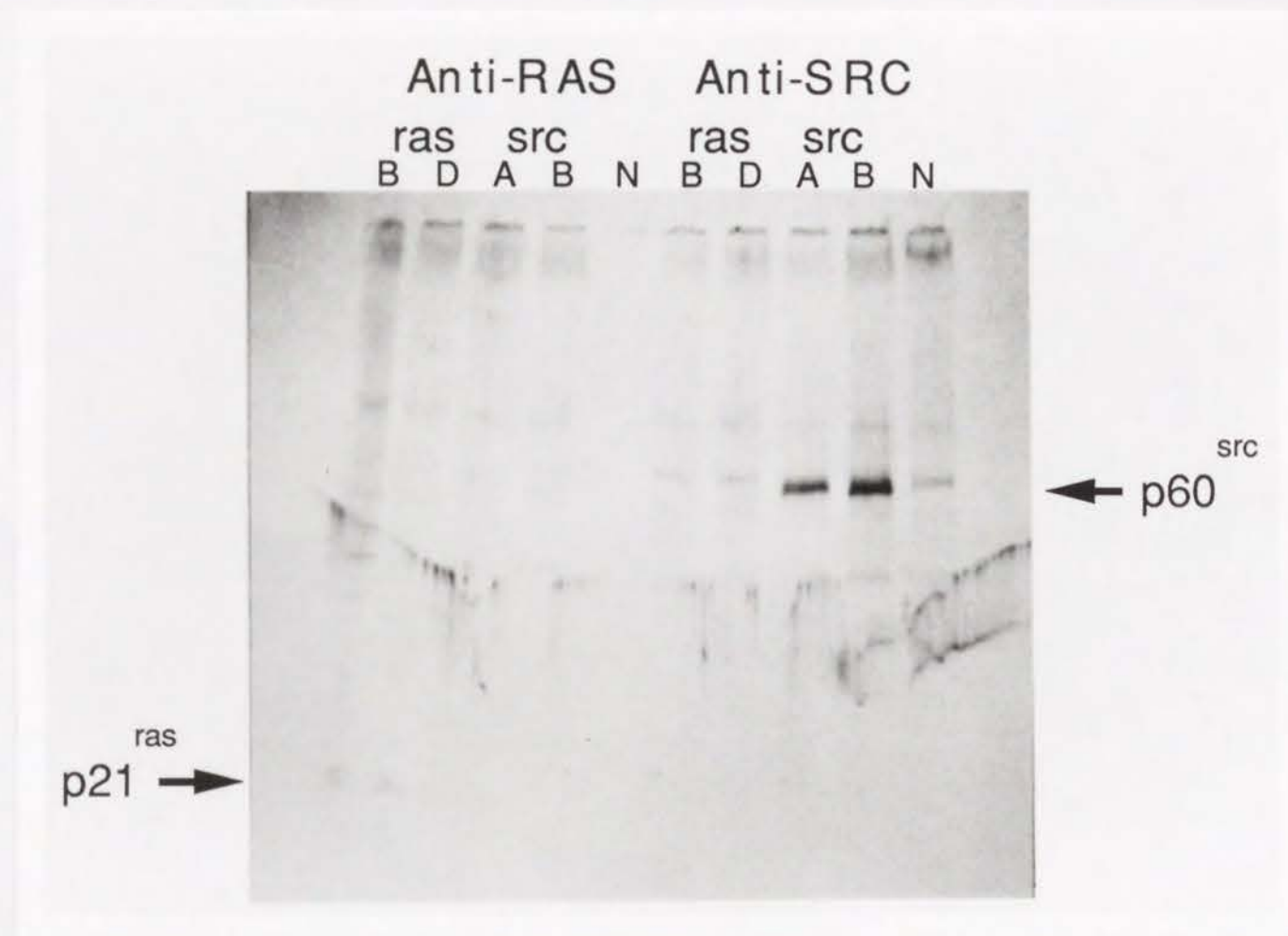


図19 単離した顆粒膜細胞株における導入遺伝子の発現を抗 H-ras 抗体および抗 v-src 抗体を用いた免疫沈降で解析した。

細胞株は LT/H-ras B1 (ras B のレーン)、LT/H-ras D (ras D のレーン)、Src A (src A のレーン)、Src B (src B のレーン) およびコントロールとして Rat 3Y1 (N のレーン) を使用した。抗 v-src 抗体を用いた場合に、3Y1 細胞および LT/H-ras の p60 の位置にみられるシグナルは c-src に由来するものであると思われる。

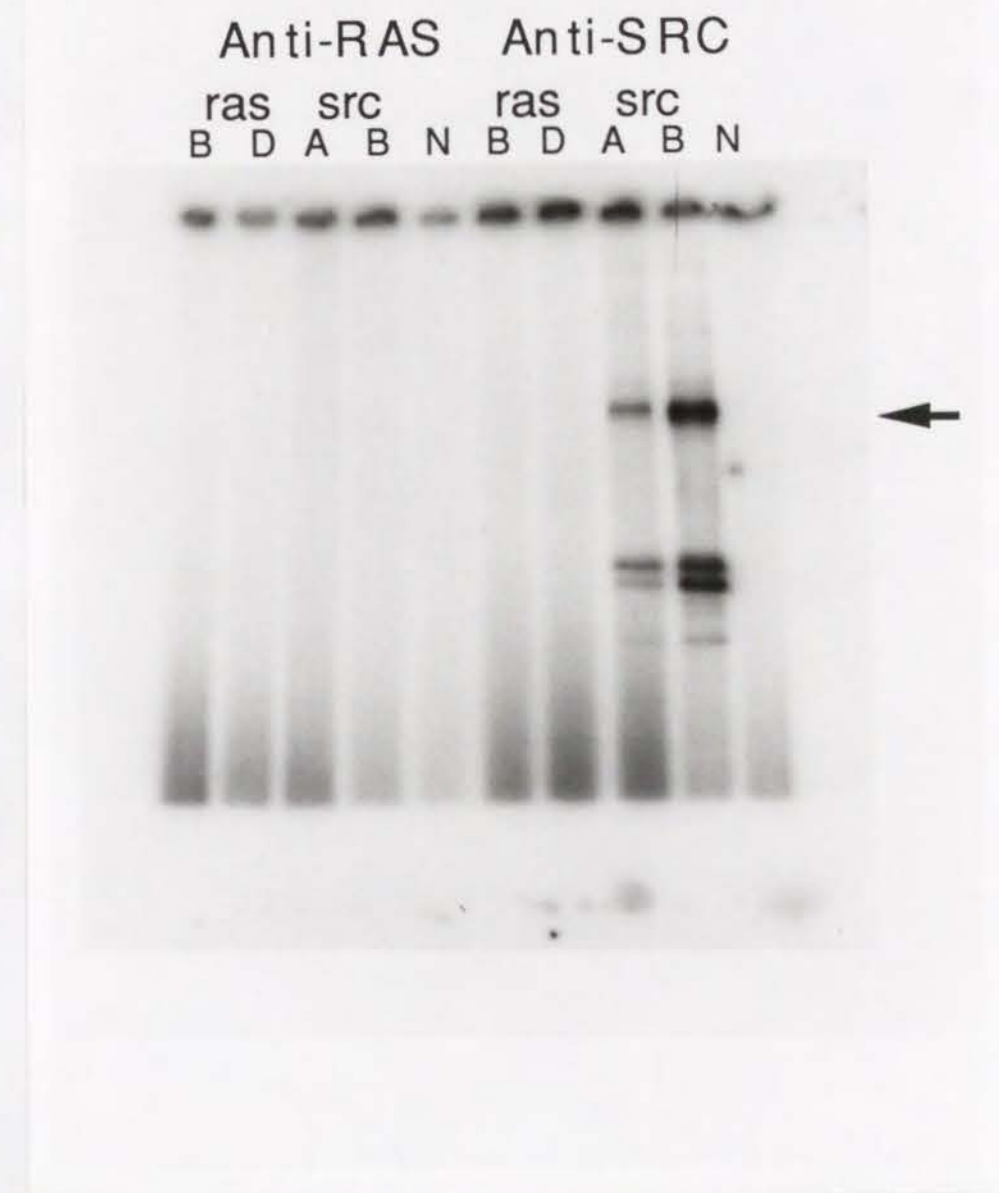
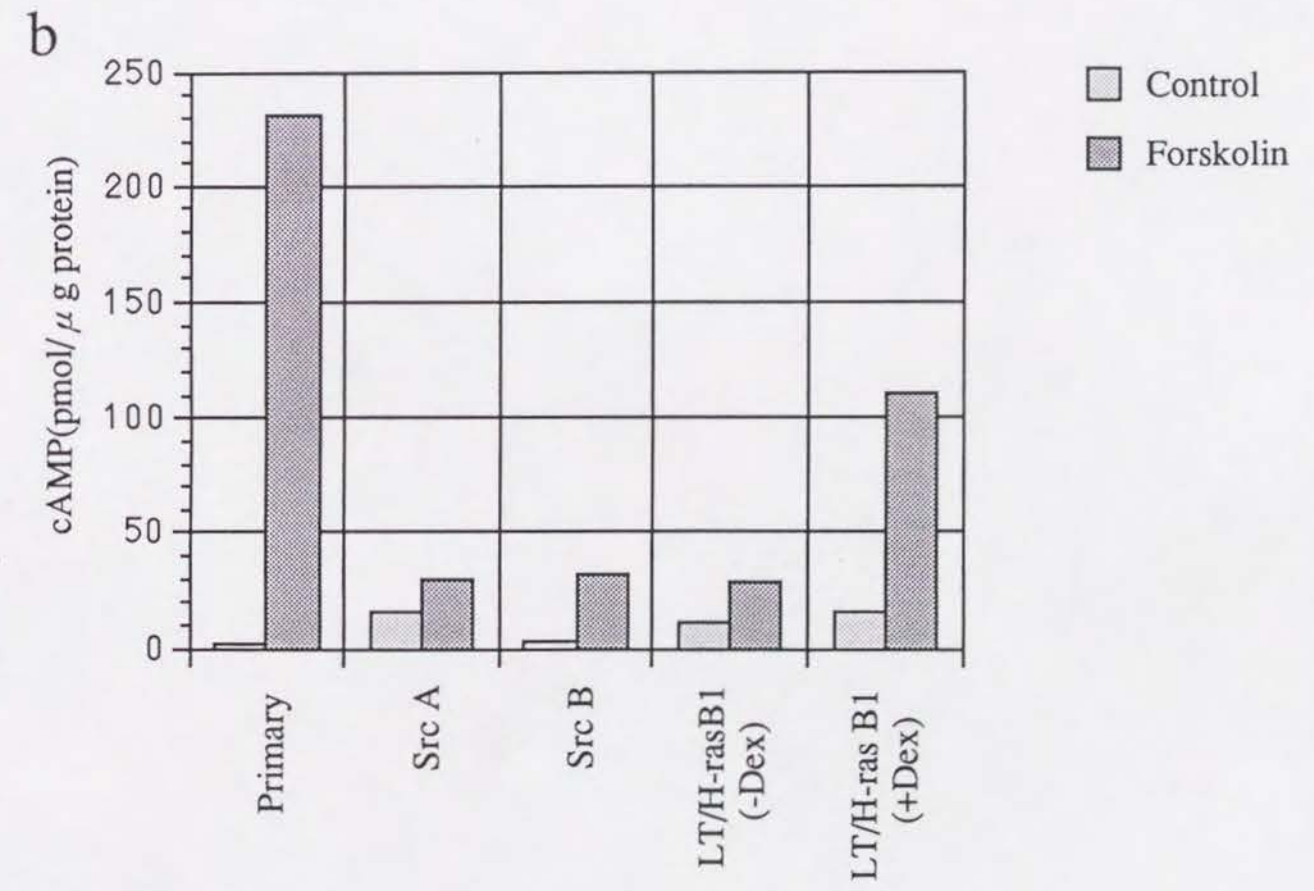
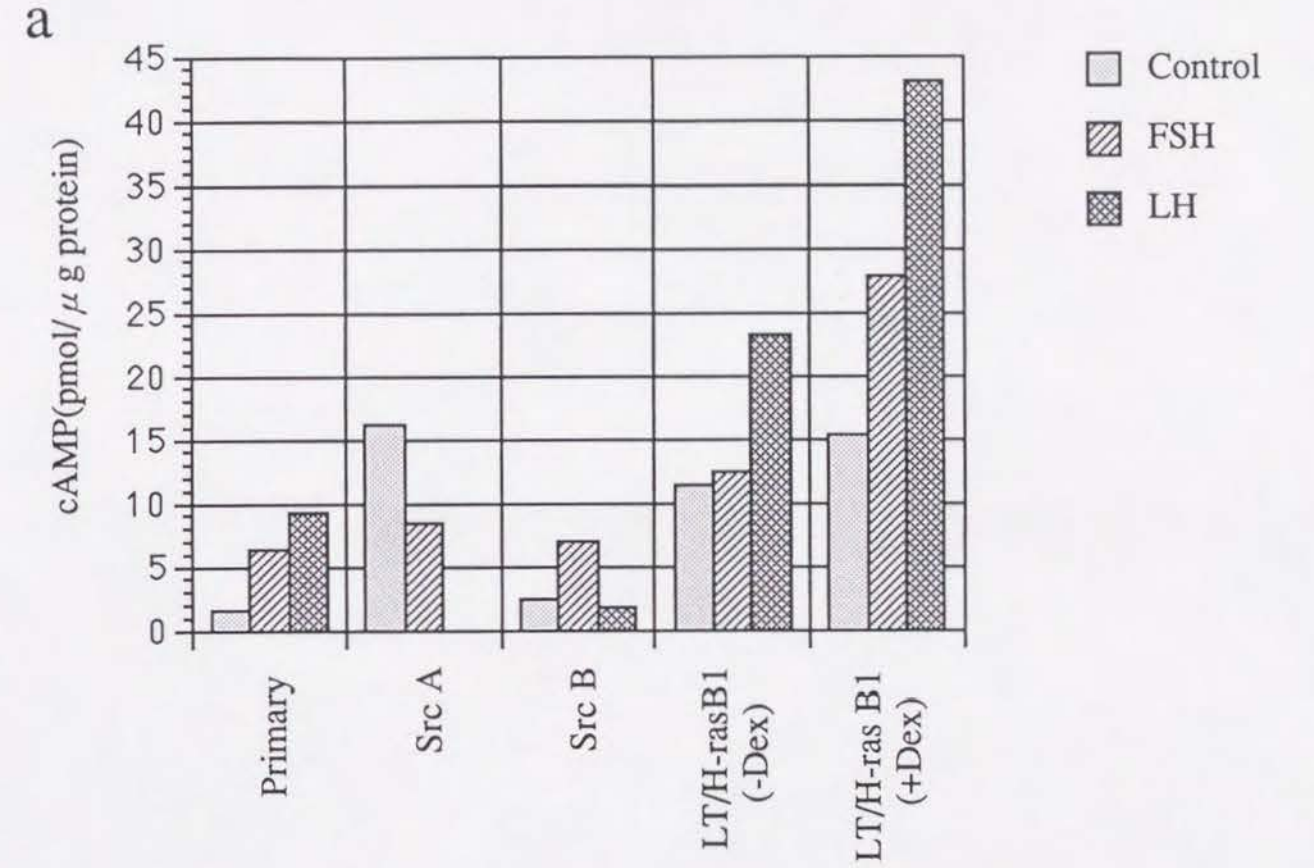


図20 顆粒膜細胞株における src kinase 活性の検出。

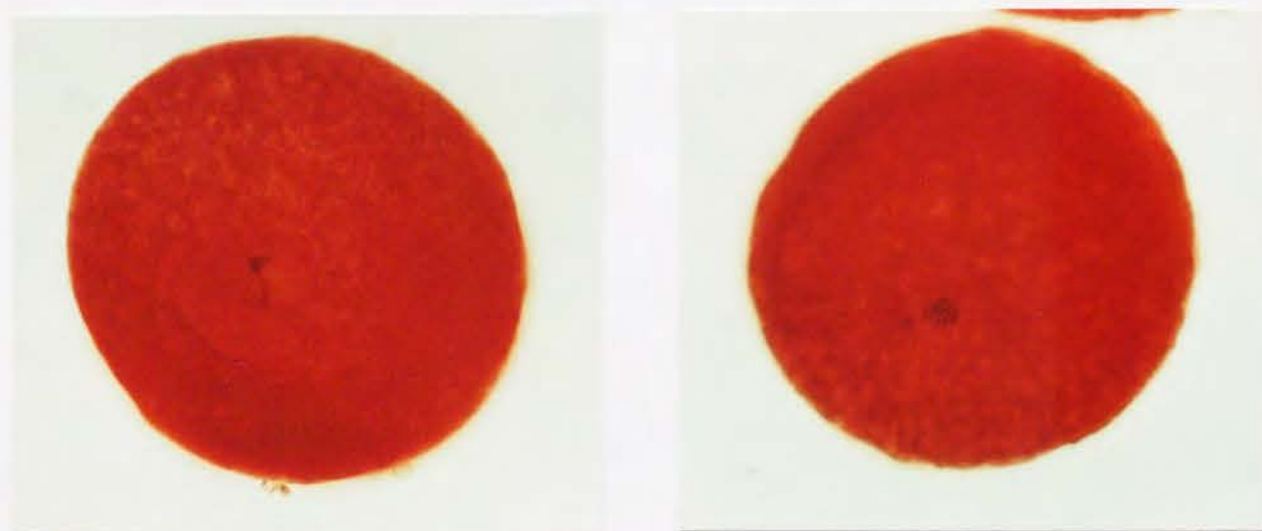
図19 で用いた各細胞の抽出液を抗 ras 抗体および抗 src 抗体で溶出し、キナーゼ活性を自己リン酸化反応により検出した。抗 src 抗体を用いた場合、v-src 遺伝子を導入した細胞株 (Src A、Src B) で p60 の位置にシグナルが認められる。

図2 1 初代顆粒膜細胞および顆粒膜細胞株における cAMP 量の変化。

初代顆粒膜細胞 (primary) または顆粒膜細胞株 (Src A, Src B, LT/H-ras B1) を FSH (a、FSH) または Forskolin (b、Forskolin) により 48 時間刺激し、得られた cAMP 量をサンプルに含まれるタンパク質量で換算して表示している。LH (a、LH) については、FSH 処理時間終了後に FSH を完全に除去した細胞に対し、100 分間の処理を行なった。コントロールとしては、各細胞をゴナドトロピンまたは Forskolin の存在しない条件で 48 時間培養したものを使用した。



a



b

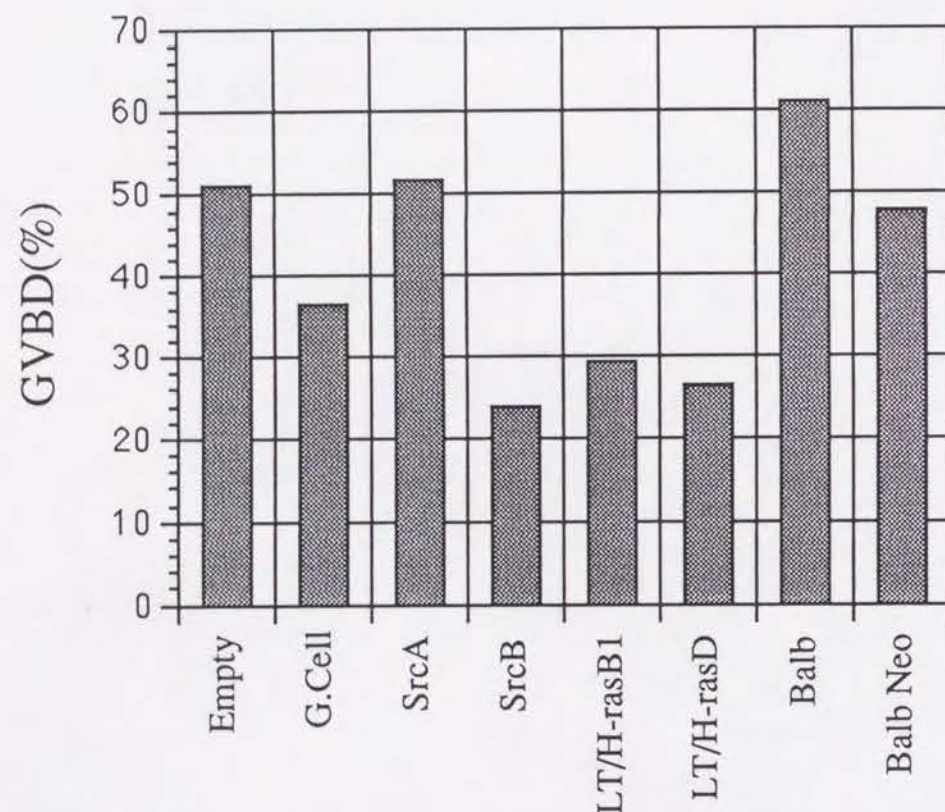


図2 2 初代顆粒膜細胞および顆粒膜細胞株の卵成熟抑制活性。

- a: 卵核胞崩壊前の卵母細胞(左)。中央左下に卵核胞と減数第一分裂前期の染色体がみえる。崩壊後の卵母細胞(右)。中央左下に減数第一分裂中期の凝縮した染色体がみえる。
- b: 各細胞上に単離した卵母細胞を加え、25時間培養を行なった。縦軸は卵成熟を再開し、卵核胞崩壊をおこした卵母細胞の割合を百分率で表している。従ってこの割合が低いほど卵成熟抑制活性が高いといえる。コントロールとして mouse Balb 3T3 細胞を使用した。

図2 3 初代顆粒膜細胞および顆粒膜細胞株における遺伝子発現量の変化。

FSH またはForskolin により4 8時間刺激した初代顆粒膜細胞(primary)または顆粒膜細胞株(Src A, Src B, LT/H-ras B1)から全RNAを調製し、スロットプロットを行なった。LHについては、FSH処理時間終了後にFSHを完全に除去した細胞に対し、さらに2 4時間の処理を行なった。コントロールとしては、各細胞をゴナドトロピンまたはForskolinの存在しない条件で4 8時間培養したものを使用した。a: プローブとしてインヒビン α -サブユニットを使用した。b: プローブとして β -アクチンを使用した。縦軸はオートラジオグラムから単位面積(mm^2)当たりの放射線量を計算した値である。

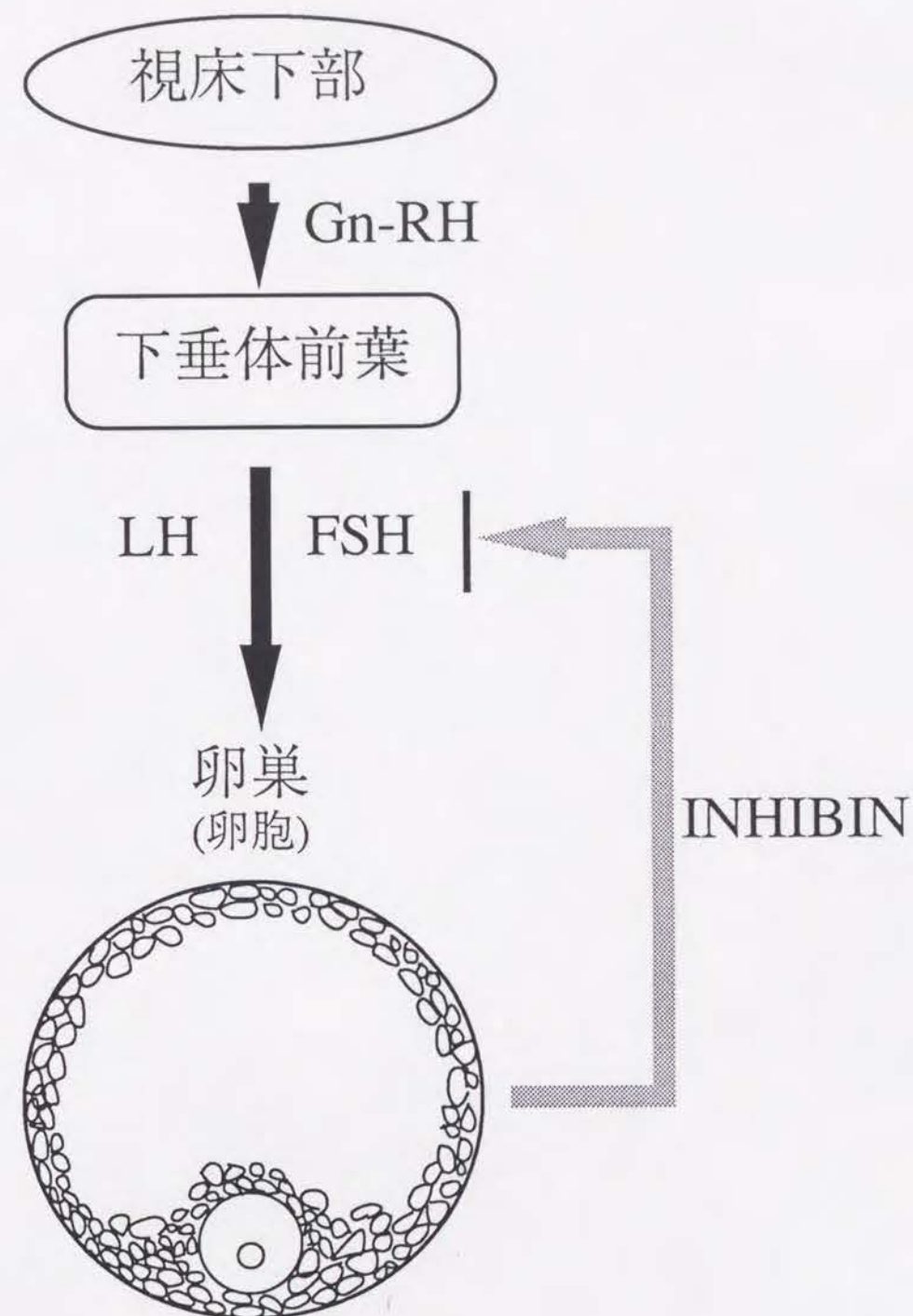
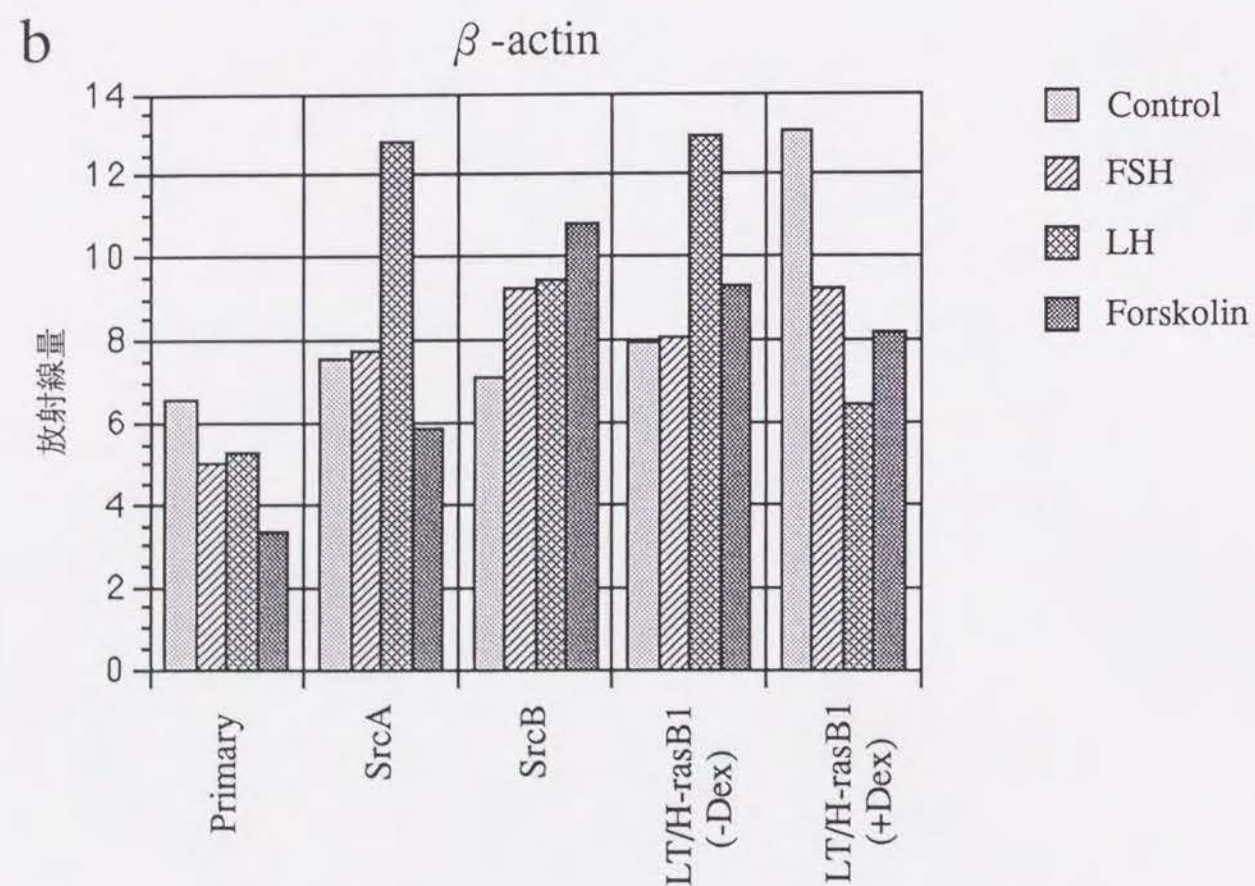
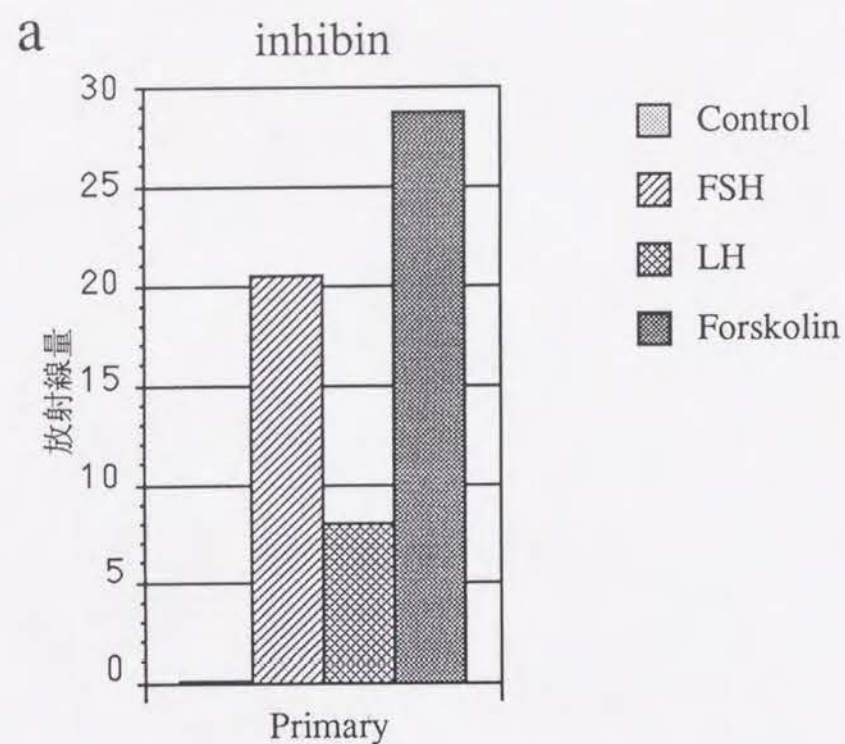


図24 インヒビンの作用機構

顆粒膜細胞特異的に発現のみられたインヒビン (TS052) は、次のような経路で作用すると考えられている。

①性腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gn-RH) は視床下部より分泌されて、脳下垂体前葉に卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を促す。②分泌された FSH は卵胞の発育を促進する。③卵胞の発育にともなう、インヒビンを産生している顆粒膜細胞はその数を増し、その結果インヒビンの分泌量は増加する。④インヒビンはその生理機能として、脳下垂体前葉の FSH 分泌を抑制するので、卵胞の発育も抑制される。

顆粒膜細胞は卵胞内で卵母細胞と共に發育することにより、その成長をモニターしている。そして下垂体からのFSH分泌にフィードバック効果を發揮し、その成長を制御している。

表1 本研究において単離した cDNA クローンとその発現特異性およびホモロジー検索の結果

Clone	特異性	Homology		Percentage	
			Nucleotide sequence	Amino acid sequence	
TS543	黄体	Bovine Collagenase Inhibitor	90	88	
TS507	黄体	Prostatic Secretory Protein	67	54	
TS537	黄体	Bovine Mitochondrion ATPase 6	73	65	
TS049	黄体	Bovine Mitochondrial Cytochrome Oxidase subunit II	79	94	
TS052	顆粒膜	Porcine Inhibin A-subunit	98		